



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Александра З. Стојановић

**УТИЦАЈ САСТАВА ФОЛИКУЛАРНЕ
ТЕЧНОСТИ НА КВАЛИТЕТ ЈАЈНИХ
ЋЕЛИЈА И ИСХОД ВАНТЕЛЕСНЕ
ОПЛОДЊЕ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2022.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Aleksandra Z. Stojanović

**UTICAJ SASTAVA FOLIKULARNE
TEČNOSTI NA KVALITET JAJNIH
ĆELIJA I ISHOD VANTELESNE
OPLODNJE**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2022.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Aleksandra Z. Stojanovic

**THE INFLUENCE OF THE FOLLICULAR
FLUID COMPOSITION ON THE QUALITY
OF OOCYTES AND THE OUTCOME
OF *IN VITRO FERTILIZATION***

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2022

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Александра З. Стојановић
Датум и место рођења: 22.07.1987. Параћин
Садашње запослење: Универзитетски клинички центар Крагујевац Центар за биомедицински потпомогнуту оплодњу
Докторска дисертација
Наслов: Утицај састава фоликуларне течности на квалитет јајних ћелија и исход вантелесне оплодње
Број страница: 113
Број слика: 19
Број табела: 30
Број графикона: 19
Број библиографских података: 241
Установа и место где је рад израђен: Универзитетски клинички центар Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: проф. др Марија Шорак, ванредни професор за ужу научну област Гинекологија и акушерство Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме:
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 01-3413/12-7 од 31.03.2021.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none">1. Доц. др Горан Бабић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, председник2. Доц. др Марија Анђелковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан3. Проф. др Биљана Божић Недељковић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none">1.2.3.
Датум одбране дисертације:

IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE (latinica)

Autor
Ime i prezime: Aleksandra Z. Stojanović
Datum i mesto rođenja: 22.07.1987. godine u Paraćinu
Sadašnje zaposlenje: Univerzitetski klinički centar Kragujevac Centar za biomedicinski potpomognutu oplodnju
Doktorska disertacija
Naslov: "Uticaj sastava folikularne tečnosti na kvalitet jajnih ćelija i ishod vantelesne oplodnje"
Broj stranica: 113
Broj slika: 19
Broj tabela: 30
Broj grafikona: 19
Broj bibliografski podataka: 241
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Univerzitetski klinički centar Kragujevac
Naučna oblast (UDK): Medicina
Mentor: prof. dr Marija Šorak, vanredni profesor za užu naučnu oblast Ginekologija i akušerstvo Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
Ocena i odbrana
Datum prijave teme:
Broj odluke I datum prihvatanja teme doktorske disertacije: 01-3413/12-7 од 31.03.2021.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenost uslova kandidata:
1. Doc. dr Goran Babić, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Ginekologija i akušerstvo, predsednik
2. Doc. dr Marija Anđelković, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Biohemija, član
3. Prof. dr Biljana Božić Nedeljković, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Imunologija, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacija:
1.
2.
3.
Datum odbrane disertacije

IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE NA ENGLISKOM JEZIKU

Author
Name and surname: Aleksandra Z. Stojanovic
Date and place of birth: 22.07.1987. Paracin
Current employment: University clinical center Kragujevac Center of Biomedically Assisted Fertilization
Doctoral Dissertation
Title: The influence of the follicular fluid composition on the quality of oocytes and outcome of <i>in vitro</i> fertilization
No. of pages: 113
No. of images: 19
No. of table: 30
No. of graph: 19
No. of bibliographic data: 241
Institution and place of work: University clinical center Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: PhD Marija Sorak, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Gynecology and Obstetrics
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 01-3413/12-7 од 31.03.2021.
Decision number and date of acceptance of the doctoral:
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. PhD Goran Babić, Assistant Professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, narrow scientific field of Gynecology and Obstetrics 2. PhD Marija Anđelković, Assistant Professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, narrow scientific field of Biochemistry 3. PhD Biljana Božić Nedeljković, Full professor Faculty of Biology, University of Belgrade, narrow scientific field of immunology
Commission for evaluation and defense of doctoral: 1. 2. 3
Date of Dissertation Defense:

ЗАХВАЛНИЦА

Првенствено хвала професорки др Марији Шорак, посебној особи и дами на менторству, бескрајном оптимизму, упорности, истрајности. Хвала на огромној помоћи, свим саветима, предусретљивости, разумевању, као и доступности и посвећености.

Хвала најбољем колективу Центра за БМПО, УКЦ Крагујевац. Захваљујем се мојим вредним биолозима на подршци, помоћи и бескрајном стрпљењу. Хвала и дивним сестрама на конструктивној сарадњи током прикупљања сагласности пацијенткиња за учешће у студији.

Захваљујем се мојим пријатељима, најбољим колегама, Службе за лабораторијску дијагностику, УКЦ Крагујевац на омогућеном експерименталном раду и прављењу неограничених разблажења. Хвала на дивној сарадњи и разумевању и летим заједничким тренуцима.

Огромну захвалност дугујем свом супругу, на гласу разума, бескрајној подршци, разумевању и стрпљењу.

Највећу захвалност дугујем мојим најбољим родитељима који су ми највећа подршка током целог мог живота. Хвала што сте ме увек гурали напред и били ветар у леђа.

Хвала мојој сестри што ми је посатавила високе циљеве.

Хвала и особи која није више са нама, а био си ми узор и подршка.

Александра

САЖЕТАК

УВОД: Једна од најуспешнијих метода за лечење инфертилитета представља биомедицински потпомогнута оплодња, а један од фактора успешности лечења је правилно сазревање једне или више јајних ћелија. Фоликуларна течност представља микросредину за развој јајних ћелија. Дефинисање параметара микросредине, који се једноставно и брзо могу детектовати, омогућавају разликовање јајних ћелија бољег, односно лошијег квалитета, потенцијално би могло повећати успешност.

ЦИЉ: Основни циљ истраживања је био да се процени утицај састава фоликуларне течности на квалитет јајних ћелија и на исход вантелесне оплодње.

МЕТОДЕ: Експериментална студија којом је обухваћено 120 пацијенткиња, које су подељене у две групе у односу на исход вантелесне оплодње и у односу на године живота. Варијабле истраживања су груписане у четири категорије: концентрација хормона (естрадиол, прогестерон, тестостерон и *FSH*), ниво *IL-6*, ниво биоелемената (Na, K, Ca, Mg и Fe) и ниво ензима (*LDH*, *AST*, *ALT* и *ALP*) у фоликуларној течности.

РЕЗУЛТАТИ: Резултати показују да зрелост јајних ћелија, као и оплодња истих корелира са концентрацијом *FSH*, тестостерона, *ALT* и *IL-6* у фоликуларној течности, док сам исход процеса вантелесне оплодње корелира са концентрацијом *FSH*, *ALT* и *IL-6* у фоликуларној течности. Вредности *FSH*, *ALT* и *IL-6* у фоликуларној течности се могу користити као предиктивни маркер исхода вантелесне оплодње.

ЗАКЉУЧАК: На основу добијених резултата можемо закључити да састав фоликуларне течности може да утиче на квалитет јајних ћелија и да укаже на исход самог процеса вантелесне оплодње.

КЉУЧНЕ РЕЧИ: Инфертилитет, биомедицински потпомогнута оплодња, *In vitro fertilization*, фоликуларна течност, јајне ћелије, ембриони, хормони, цитокини, ензими, биоелементи

ABSTRACT

INTRODUCTION: One of the methods for treating the infertility is in vitro fertilization, and one of the main elements for the successful treating is actually accurate growth of one or more oocytes. Follicle fluid represents a micro environment for the growth of oocytes while they go through different phases of growth. Defining certain parameters of the micro environment, which can be easily and quickly detected, and which enable differentiating oocytes of better or worse quality, can potentially increase the success.

AIM: The main aim of this research was to estimate the effect of the structure of follicle fluid on oocytes quality, and the biomedically assisted fertilization.

METHODS: Experimental study included 120 patients, the analysed patients were divided into two groups based on the outcome of IVF and of age. Variable researches are grouped in four categories: concentration of hormones (estradiol, progesterone, testosterone, and FSH), level IL-6, level of bio-elements (Na, K, Ca, Mg and Fe) and the level of enzymes (*LDH*, *AST*, *ALT* and *ALP*) in follicle fluid.

THE RESULTS: The results show that the maturity of oocytes, as well as the in vitro fertilization of them correlates with the concentration of *FSH*, testosterone, *ALT* and *IL-6* in follicle fluid. The values of *FSH*, *ALT* and *IL-6* in follicle fluid can be used as a predictive marker of the outcome of in vitro fertilization.

CONCLUSION: Based on the results given it can be concluded that the collection of follicle fluid can influence the quality of oocytes and show the outcome of the process itself.

KEY WORDS: infertility, biomedically assisted fertilization, In vitro fertilization, follicular fluid, oocytes, embryos, hormones, cytokines, enzymes, bioelements

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

<i>БМПО</i>	Биомедицински потпомогнута оплодња
<i>ART</i>	Асистирани репродуктивне технике (од енг. <i>Assisted reproductive techniques</i>)
<i>WHO</i>	Светска здравствена организација (од енг. <i>World Health Organization</i>)
<i>IUI</i>	Интраутерина инсеминација (од енг. <i>Intrauterine insemination</i>)
<i>FF</i>	Фоликуларна течност (од енг. <i>Follicular fluid</i>)
<i>FSH</i>	Фоликулостимулирајући хормон (од енг. <i>Folliculo stimulating hormone</i>)
<i>LH</i>	Лутеинизирајући хормон (од енг. <i>Luteinizing hormone</i>)
<i>GnRH</i>	Гонадотропин ослобађајући хормон (од енг. <i>Gonadotropin-releasing hormone</i>)
<i>hCG</i>	Хумани хорионски гонадотропин (од енг. <i>Human chorionic gonadotropin</i>)
<i>ZP</i>	Зона пелуцида (од енг. <i>Zona pellucida</i>)
<i>IGF-1</i>	Инсулину сличан фактор раста 1 (од енг. <i>Insuline-like growth factor 1</i>)
<i>TGFβ</i>	Трансформишући фактор раста бета (од енг. <i>Transforming growth factor β</i>)
<i>AMH</i>	Anti-Müllerov хормон (од енг. <i>Anti-Müllerian hormon</i>)
<i>GV</i>	Герминална везикула (од енг. <i>Germinal vesicle</i>)
<i>MPF</i>	Фактор промоције М фазе (од енг. <i>Maturation promoting factor</i>)
<i>DNA</i>	Дезоксирибонуклеинска киселина (од енг. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
<i>mRNA</i>	Информационе рибонуклеинске киселине (од енг. <i>Messenger ribonucleic acid</i>)
<i>PVS</i>	Перивителински простор (од енг. <i>Perivitelline space</i>)
<i>ZP</i>	Зона пелуцида (од енг. <i>Zona pellucida</i>)
<i>PBI</i>	Прво поларно тело
<i>MV</i>	Микровили (од енг. <i>Microvili</i>)
<i>SP</i>	Деобно вретено (од енг. <i>Spindle apparatus</i>)
<i>MT</i>	Микротубули (од енг. <i>Microtubules</i>)
<i>Ch</i>	Хромозоми (од енг. <i>Chromosomes</i>)
<i>G</i>	Голџијев комплекс (од енг. <i>Golgi body</i>)
<i>CG</i>	Кортикалне грануле (од енг. <i>Cortical granules</i>)
<i>M</i>	Митохондрије (од енг. <i>Mitochondria</i>)
<i>FC</i>	Фоликуларне ћелије (од енг. <i>Follicular cells</i>)
<i>GJ</i>	Пукотински спој између две фоликуларне ћелије (од енг. <i>gap junctions</i>)
<i>rER</i>	Гранулирани ендоплазматични ретикулум (од енг. <i>Rough endoplasmic reticulum</i>)
<i>tRNA</i>	Транспортна рибонуклеинска киселина (од енг. <i>Transport ribonucleic acid</i>)
<i>PB</i>	Поларно тело (од енг. <i>Polar body</i>)
<i>COC</i>	Комплекс кумулуса и јајне ћелије (од енг. <i>Cumulus oocyte complex</i>)
<i>ROS</i>	Реактивне врсте кисеоника (од енг. <i>Reactive oxygen species</i>)
<i>EFG</i>	Епидермални фактор раста (од енг. <i>Epidermal growth factor</i>)
<i>TGF-α</i>	Трансформишући фактор раста алфа (од енг. <i>Transforming growth factor alpha</i>)
<i>cAMP</i>	Циклични аденозин монофосфат (од енг. <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>)
<i>NADPH</i>	Никотинамид аденин динуклеотид хидрокси фосфат (од енг. <i>Nikotinamid adenin dinukleotid hidroxi fosfat-</i>)
<i>ATP</i>	Аденозин трифосфат (од енг. <i>Adenosine tri phosphate</i>)
<i>IL-6</i>	Интерлеукин 6 (од енг. <i>Interleucin 6</i>)
<i>Ca</i>	Калцијум (од енг. <i>Calcium</i>)
<i>Mg</i>	Магнезијум (од енг. <i>Magnesium</i>)
<i>Cu</i>	Бакар (од енг. <i>Copper</i>)

Zn	Цинк (од енг. <i>Zinc</i>)
Fe	Гвожђе (од енг. <i>Iron</i>)
Cr	Хром (од енг. <i>Chrome</i>)
Rb	Рубидијум (од енг. <i>Rubidium</i>)
ADP	Аденозин дифосфат (од енг. <i>Adenosine diphosphate</i>)
LDH	Лактат дехидрогеназа (од енг. <i>Lactate dehydrogenase</i>)
AST	Аспартат аминотрансфераза (од енг. <i>Aspartate aminotransferase</i>)
ALT	Аланин аминотрансфераза (од енг. <i>Alanine Aminotransferase</i>)
ALP	Алкална фосфатаза (од енг. <i>Alkaline phosphatase</i>)
COH	Контролисана оваријална хиперстимулација (од енг. <i>Controlled ovarian hyperstimulation</i>)
IVF	<i>In vitro</i> оплодња (од енг. <i>In vitro fertilization</i>)
ICSI	Интрацитоплазматска инјекција сперматозоида (од енг. <i>Intracitoplasmic sperm injection</i>)
ET	Ембриотрансфер
HMG	Хумани менопаузални гонадотропин (од енг. <i>Human menopausal gonadotropin</i>)
rFSH	Рекомбинантни фоликулостимулирајући хормон (од енг. <i>Recombinant follicle stimulating hormone</i>)
rLH	Рекомбинантни лутеинизирајућ хормон (од енг. <i>Recombinant luteinizing hormone</i>)
sER	Глатки ендоплазматични ретикулум (од енг. <i>Smooth endoplasmic reticulum</i>)
PN	Пронуклеус (од енг. <i>Pronucleus</i>)
NPB	Пронуклеолус (од енг. <i>Nucleolar precursor body</i>)
ICM	Унутрашња ћелијска маса (енг. <i>Inner cell mass</i>)
TE	Трофоектодерм (од енг. <i>Trophectoderm</i>)
VDRL	<i>Venereal disease research laboratory test</i>
HbsAg	Хепатитис Б (од енг. <i>Hepatitis B surface antigen</i>)
HCV	Хепатитис Ц (од енг. <i>Hepatitis C virus</i>)
HIV	Вирус хумане имунодефицијенције (од енг. <i>human immunodeficiency virus</i>)
TSH	Тиреостимулирајући хормон (од енг. <i>Thyroid stimulating hormone</i>)
T3	Тријод тиронин (од енг. <i>Triiodothyronine</i>)
T4	Тироксин (од енг. <i>Thyroxine</i>)
BMI	Индекс телесне масе (од енг. <i>Body mass index</i>)
Min	Минимум (од енг. <i>Minimum</i>)
Max	Максимум (од енг. <i>Maximum</i>)
SD	Стандардна девијација (од енг. <i>Standard deviation</i>)

САДРЖАЈ

I УВОД.....	1
1.1. Менструални циклус, фоликулогенеза и оогенеза	2
1.1.1. Менструални циклус	2
1.1.2. Фоликулогенеза	5
1.1.3. Оогенеза и мејоза.....	7
1.2. Функције хормона јајника	9
1.3. Грађа јајне ћелије.....	10
1.4. Фоликул и фоликуларна течност као микросредина јајне ћелије.....	11
1.4.1. Естрадиол, прогестерон, тестостерон, FSH	12
1.4.2. АМХ и витамин Д.....	13
1.4.3. Интерлеукин 6.....	14
1.4.4. Биоеlementи (калијум, натријум, магнезијум, калцијум, гвожђе).....	14
1.4.5. Ензими	15
1.5. Биомедицински потпомогнута оплодња.....	16
1.5.1. Контролисана оваријална хиперстимулација	17
1.5.2. Аспирација јајних ћелија	18
1.5.3. Оплодња јајних ћелија и култивација ембриона.....	18
1.5.4. Ембриотрансфер.....	18
1.6. Морфологија јајне ћелије, зигота и ембриона под микроскопом	19
1.6.1. Јајна ћелија (0. дан)	20
1.6.2. Зигот (дан 1.).....	24
1.6.3. Ембрион (дан 2. и 3.)	25
1.6.4. Бластоциста (дан 5.)	28
II ЦИЉ СТУДИЈЕ.....	29
III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	301
3.1. Испитивана популација.....	32
3.2. Материјал.....	33
3.3. Методе.....	35
3.3.1. Стимулација овулације	35
3.3.2. Аспирација јајних ћелија	36
3.3.3. Ембриолошки поступци током процеса <i>IVF</i>	36

3.3.4. Варијабле које се мере у студији.....	41
3.3.5. Статистичка обрада и презентација резултата.....	42
IV РЕЗУЛТАТИ.....	44
4.1. Подаци о пацијенткињама које су учествовале у студији.....	44
4.1.1. Године старости, <i>BMI</i> и <i>AMH</i> у серуму.....	44
4.1.2. Карактеристике оваријалног одговора.....	47
4.1.3. Квалитет јајних ћелија и успех фертилизације.....	51
4.1.4. Квалитет ембриона.....	57
4.1.5. Исход процеса вантелесне оплодње.....	63
4.2. Састав фоликуларне течности.....	66
4.2.1. Корелација састава фоликуларне течности и година старости, <i>BMI</i> и серумског <i>AMH</i>	71
4.2.2. Корелација састава фоликуларне течности и карактеристике оваријалног одговора.....	73
4.2.3. Корелација састава фоликуларне течности и квалитет јајних ћелија и успех фертилизације.....	75
4.2.4. Корелација састава фоликуларне течности и квалитет ембриона и исход процеса вантелесне оплодње.....	76
4.3. Састав фоликуларне течности као предиктивни маркер исхода процеса вантелесне оплодње.....	78
VI ДИСКУСИЈА.....	83
VII ЗАКЉУЧАК.....	94
VIII ЛИТЕРАТУРА.....	96
БИОГРАФИЈА:.....	113
БИБЛИОГРАФИЈА.....	113

I УВОД

Рођење прве бебе из поступка биомедицински потпомогнуте оплодње (*БМПО*) 25. јула 1978. године у Енглеској представља једно од највећих медицинских достигнућа двадесетог века, прекретницу у борби са инфертилитетом и почетак периода развоја асистираних репродуктивних техника (енг. *Assisted reproductive techniques - ART*) (1). *БМПО* од својих почетака улазила је у неке од највећих животних тајни и постала предмет бројних оспоравања (2). Непуне четири деценије од рођења прве бебе из поступка *БМПО*, сам поступак је доживео огроман напредак у успешности исхода, обиму употребе и прихватљивости од стране друштва (3). У Србији прва беба из процеса *БМПО* је рођена 27. јуна 1987. године уз помоћ врхунских стручњака Гинеколошко-акушерске болнице „Народни фронт“.

У протекле три деценије бележи се значајан пораст броја пацијената који се боре са инфертилитетом. Према Светској здравственој организацији (енг. *World Health Organization - WHO*) инфертилитет се клинички дефинише као болест репродуктивног система коју карактерише неуспех у постизању успешне трудноће након дванаест месеци редовних незаштићених полних односа (4). Инфертилитет се дели на **примарни** и **секундарни**. Примарним инфертилитетом се сматра немогућност постизања трудноће где пацијенткиња никада није имала трудноће, док је секундарни инфертилитет немогућност зачећа након претходно зачете трудноће. Процењује се да је данас неплодно од 8 до 12% парова што инфертилитет чини болешћу са високом преваленцом (5).

Узроци инфертилитета су бројни и подједнако заступљени код мушкараца и жена: у 30-40% случајева узрок инфертилитета пара је повезан са поремећајима код жене, у 40% код мушкарца, док је у преосталих 20-30% узрок комбинација поремећаја присутних и код мушкарца и код жене (6). На немогућност зачећа природним путем утичу бројни узроци, као што су године жене, пушење, телесна тежина, употреба лекова, присутност инфекција, придружене хроничне болести, оштећења и аномалије урогениталног система, као и психолошки фактори (5, 7, 8). Како је етиологија инфертилитета врло различита, такви су и начини лечења. Једна од почетних метода лечења којом се настоји повећати шанса пара за природним зачећем је одређивање тачног времена овулације (трансвагиналним ултразвуком) и одређивањем нивоа полних хормона, а на основу тога и темпирање односа. Уколико нема успеха, наставља се са лечењем и то најчешће поступком интраутерине инсеминације (енг. *Intrauterine insemination- IUI*), током ког гинеколог катетером убризгава претходно обрађен узорак ејакулата у материцу жене и то када фоликул достигне одређену величину (фоликул који је пред пуцањем или непосредно након пуцања). Уколико се такве једноставне методе лечења покажу неуспешнима предлаже се сложенија метода- *In vitro* оплодња (од енг. *In vitro fertilization*) (6).

Успешан исход самог процеса *IVF* зависи од квалитета полних ћелија (сперматозоида и јајне ћелије), успешне интеракције између њих, оплодње, деобе зигота и ефикасне имплантације ембриона у зид ендометријума материце (9). Лечење неком од техника *IVF* има највећу стопу трудноће без обзира на узрок инфертилитета (10). Основни поступак *IVF* укључује следеће кораке: стимулација јајника, пункција фоликула, колекција јајних ћелија, обрада и одабир сперматозоида, оплодња, култивација ембриона, трансфер ембриона и замрзавање свих прекобројних квалитетних ембриона, одмрзавање и трансфер ембриона у неком наредном менструалном циклусу (11).

Један од фактора успешности *IVF* је управо правилно сазревање једне или више јајних ћелија. Главни циљ ембриолога је процена квалитета јајне ћелије на основу

морфологије комплекса кумулуса и јајне ћелије и на основу морфологије саме јајне ћелије након отклањања ћелија кумулуса. Ембриолози су недавно предложили употребу фоликуларне течности (енг. *Follicular fluid- FF*) у сврху процене квалитета јајних ћелија, јер успешна имплантација зависи од квалитета јајних ћелија, као и од рецептивности ендометријума. Фоликуларна течност представља микросредину за развој јајних ћелија док пролазе кроз различите фазе сазревања (11). На квалитет јајне ћелије значајан утицај има окружење у којем се она налази, тзв. микросредина која укључује ћелије кумулуса, фоликуларну течност у којој се излучују хормони и фактори раста укључени у њен раст и развој (12). Дефинисање појединих параметара микросредине, који се једноставно и брзо могу детектовати, а који омогућавају разликовање јајних ћелија бољег, односно лошијег квалитета, потенцијално би могло повећати успешност метода *IVF*. Свака промена у саставу *FF* може се одразити на јајну ћелију, што може да утиче на њен развој и квалитет, оплодњу и рани ембрионални развој (13, 14, 15, 16, 17).

1.1. Менструални циклус, фоликулогенеза и оогенеза

Гаметогенеза је први стадијум у коме се из герминативних ћелија стварају високо диференциране полне ћелије, гамети, који представљају репродуктивне јединице. Формирање женских полних ћелија назива се **оогенеза**, а мушких **сперматогенеза**. Зрела јајна ћелија постаје спремна за оплодњу кроз паралелно и усклађено одвијање **фоликулогенезе** и **оогенезе** (18). **Фоликулогенеза** подразумева раст и сазревање фоликула који у себи садржи незрелу јајну ћелију која је у развоју, при чему се примордијални фоликули развијају у велике преовулацијске фоликуле. **Оогенеза** подразумева развој јајне ћелије, сазревање њеног једра у мејотичкој деоби, али и развој цитоплазме (19, 4).

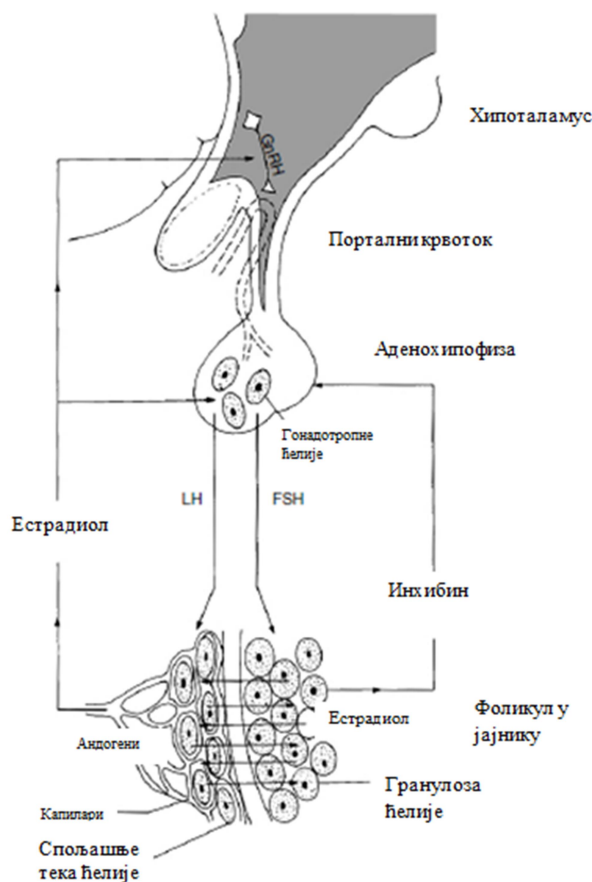
За настанак зреле јајне ћелије, али и припрему материце за евентуалну трудноћу, неопходно је постојање **менструалног циклуса** који се одвија под контролом целог низа хормона (4, 20). У природном менструалном циклусу, нису све јајне ћелије предодређене за овулацију - сваки месец велики број њих пропадне, док у стимулираним циклусима то није случај (21). Током феталног развоја и раног детињства, фоликули се развијају до раног антралног стадијума, са успостављањем нормалног менструалног циклуса, у пубертету, долази до њиховог даљег сазревања под утицајем фоликулостимулирајућег хормона (енг. *Folliculo stimulating hormone- FSH*) и лутеинизирајућег хормона (енг. *Luteinizing hormone- LH*) (22). Унутар фоликула, јајна ћелија је у сталној интеракцији са ћелијама кумулуса које је окружују, са гранулоза ћелијама, али и са течностима која испуњава фоликул (23).

1.1.1. Менструални циклус

Женски хормонски систем има три хијерархијски повезана нивоа (Слика 1):

1. **Гонадотропин ослобађајући хормон** хипоталамуса (енг. *Gonadotropin-releasing hormone- GnRH*),
2. Хормони аденохипофизе: ***FSH*** и ***LH*** који се луче под утицајем *GnRH*

3. Хормони које луче јајници (естроген и прогестерон) под дејством хормона аденохипофизе.



Слика 1. Шематски приказ ендокрине контроле у репродукцији (модификовано из Elder и Dale 2011)

Интересантно је да се у току менструалног циклуса ови хормони не излучују у константним количинама, већ постоје изразите разлике у току појединих фаза циклуса. Количина излученог *GnRH* из хипоталамуса током менструалног циклуса незнатно осцилира, док се лучење *LH* и *FSH* циклично повећава и смањује, што за последицу има цикличне промене у јајницима (4, 20).

У детињству хормони аденохипофизе скоро да се и не луче, па су и јајници неактивни. Почев од девете године аденохипофиза почиње прогресивно да лучи све веће количине *LH* и *FSH*, што у узрасту између 11 и 15 године резултује почетком нормалног менструалног циклуса. Период наведених промена назива се пубертет, а први менструални циклус менарха (4, 20). *LH* и *FSH* стимулишу циљне ћелије у јајницима, везујући се за специфичне *LH* и *FSH* рецепторе на мембрани ових ћелија. Стимулисане циљне ћелије повећавају своју секрецију, а такође долази и до њиховог раста и пролиферације. Скоро сви стимулаторни ефекти *LH* и *FSH* настају због активације система аденозин монофосфатног секундарног гласника у цитоплазми циљних ћелија, који даље доводи до стварања протеин киназе и фосфорилације кључних ензима који покрећу синтезу полних хормона (4).

Менструални циклус се може поделити на две фазе (Слика 2):

- Прву фазу обухватају промене које се дешавају у јајнику (**оваријални циклус**) и односе се на промене у фоликулу.
- Другу фазу обухватају догађаји који се дешавају унутар материце (**утерини циклус**) и односе се на промене ендометријума (24, 25, 26).

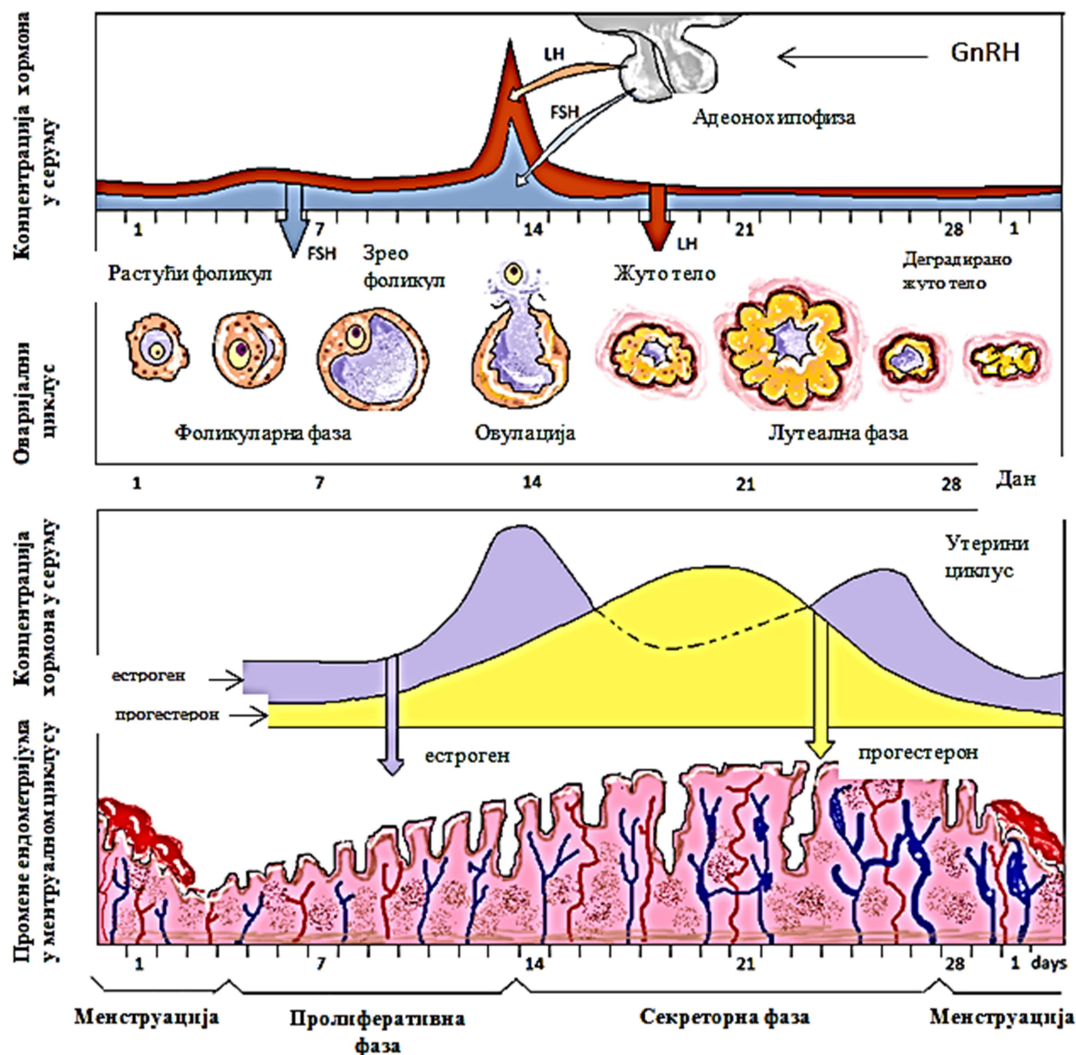
Оваријални циклус се састоји од (Слика 2):

- **фоликуларне фазе,**
- **овулације и**
- **лутеинске фазе.**

Утерини циклус одвија кроз (Слика 2):

- **менструалну,**
- **пролиферативну и**
- **секреторну фазу (24).**

Раст фоликула који се припремају за овулацију се дешава током фоликуларне фазе оваријалног циклуса, ова фаза се делимично преклапа са пролиферативном фазом утериног циклуса. Нагли пораст *LH* доводи до овулације тј ослобађања јајне ћелије пуцањем фоликула и она прелази у јајовод (27). Јајна ћелија довршава сазревање и започиње процес ембриогенезе уколико дође до оплодње. Уколико оплодња изостане, јајна ћелије ће пропасти. Три дана од оплодње је потребно ембриону да стигне до материце и још три дана за имплантацију у ендометријум и тада је у стадијуму бластоцисте. Лутеинска фаза је последња фаза оваријалног циклуса, а поклапа се са секреторном фазом утериног циклуса. Остаци овулираног фоликула прелазе у жуто тело (lat. *corpus luteum*) под утицајем *FSH* и *LH*. Жуто тело почиње да лучи прогестерон и хормоне који супримирају излучивање *FSH* и *LH*. Уколико изостане зачеће жуто тело пропада, смањује се излучивање прогестерона, јавља се менструација и почетак новог менструалног циклуса. Уколико је дошло до зачећа жуто тело наставља да лучи прогестерон, из трофобласта почиње да се излучује хумани хорионски гонадотропин (енг. *Human chorionic gonadotropin- hCG*), а менструација изостаје. Менструација је прва фаза утериног циклуса, а карактерише је појава менструалног крварења (24). Следи пролиферативна фаза током које ендометријум материце пролиферише. Секреторна фаза је последња фаза утериног циклуса када под утицајем прогестерона, који излучује жуто тело, ендометријум материце се мења и постаје погодан за имплантацију бластоцисте и потпору ране трудноће (24, 26, 27, 28).



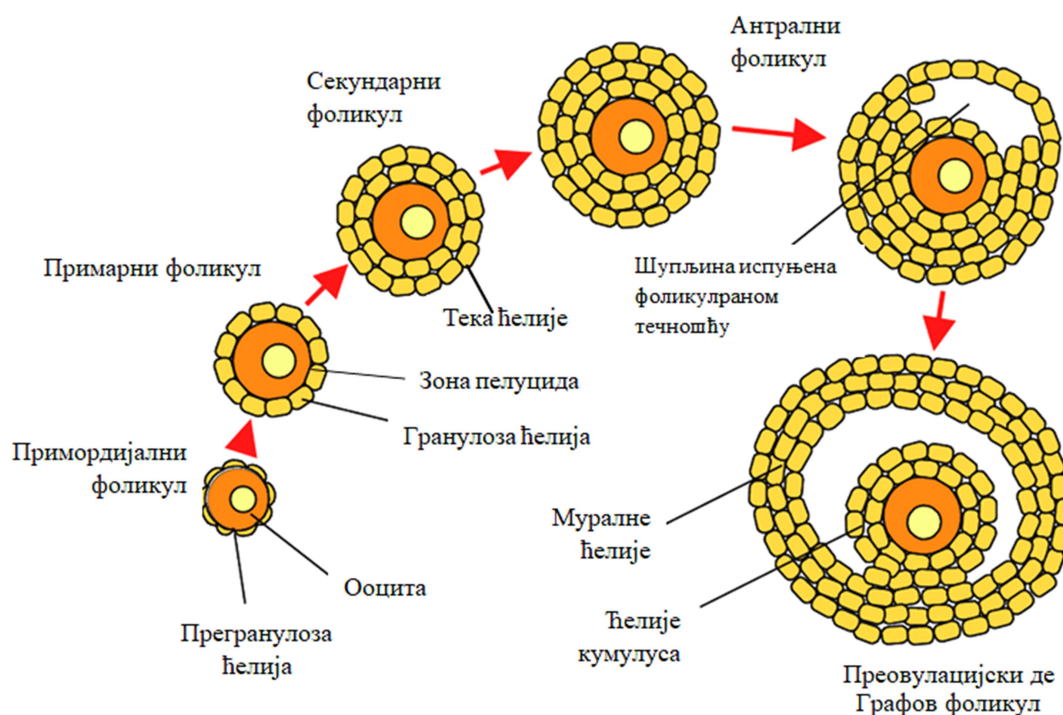
Слика 2. Менструални циклус кроз фазе
(преузето са сајта и модификовано: <http://bioxeocotobade.pbworks.com>)

1.1.2. Фоликулогенеза

Фоликулогенеза је процес током ког од примордијалног фоликула, преко примарног, преантралног и антралног, настаје преовулацијски фоликул (29). Непрекидним растом и развојем примордијалних фоликула настају фоликули вишег развојног стадијума и представљају фоликуларну резерву јајника. Број примордијалних фоликула је највећи у феталном добу и од тада се тај број непрекидно смањује све до краја репродуктивног живота жене (30, 31). На Слици 3 је представљен процес фоликулогенезе кроз фазе раста и развоја фоликула.

Примордијални фоликули се састоје од јајне ћелије заустављене у профази прве мејотичке деобе која је окружена једним слојем вретенастих фоликуларних ћелија.

Растом јајне ћелије, као и умножавањем и диференцијацијом једног слоја гранулоза ћелија уско повезаних са зоном пелуцидом (енг. *Zona pellucida- ZP*) и тека ћелија, примордијални фоликул диференцира се и прелази у **примарни фоликул** (32, 33). Даљом пролиферацијом гранулоза ћелија (експресија рецептора за *FSH*) и тека ћелија (експресија рецептора за *LH*) око јајне ћелије настају **преантрални или секундарни фоликули** (28). Гранулоза ћелије формирају неколико слојева око јајне ћелије, док се тека ћелије диференцирају у унутрашње (лат. *theca interna*) и спољашње (лат. *theca externa*). Између гранулоза и тека ћелија формира се базална мембрана. **Антрални фоликул**, промера до 3 mm, у којима долази до стварања шупљине између ћелија и нагомилавање фоликуларне течности настају растом и развојем преантралних фоликула. Гранулоза ћелије се диференцирају у муралне ћелије (повезане са зидом фоликула) и ћелије кумулуса (повезане са јајном ћелијом). **Преовулацијски (де Графови фоликули)** настају растом антралних фоликула и достижу величину до 25 mm. У овом фоликуларном стадијуму формира се група ћелија названа кумулус оофорус, унутар које се налази јајна ћелија (27).



Слика 3. Фоликулогенеза

(Преузето са сајта и модификовано: https://www.researchgate.net/figure/A-schematic-drawing-of-the-stages-of-folliculogenesis_fig2_47931992)

Процес фоликулогенезе је уско повезан и веома зависан од процеса стероидогенезе, тј. синтезе и лучења полних хормона. Прогестерон представља прекурсор за синтезу андрогена и естрогена и настаје од холестерола преко прегненолона. Управо ово представља процес неопходан за синхронизован раст фоликула и развој јајних ћелија. Овај низ реакција се дефинише као **стероидогенеза**.

Генску експресију рецептора за *FSH* и рецептора инсулину сличног фактора раста 1 (енг. *Insuline-like growth factor 1 - IGF-1*) у гранулоза ћелијама појачавају андрогени путем властитог рецептора и на тај начин подстичу раст преантралних и малих антралних фоликула (26). Диференцијацију гранулоза ћелија у муралне ћелије и ћелије кумулуса у антралном фоликулу подстиче интеракција растућег фоликула са нивоом *FSH*, факторима раста и факторима које излучује јајна ћелија (34). Тека ћелије почињу да стварају андроген (под утицајем *LH*), њега гранулоза ћелије ароматизују (под дејством *FSH*) у естроген (26).

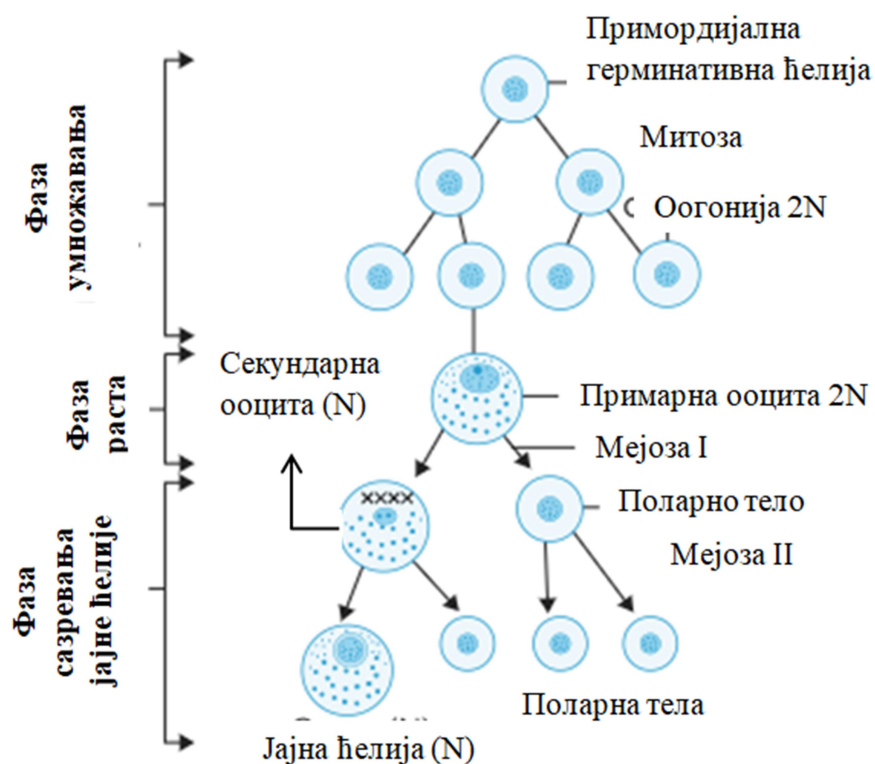
Јајна ћелија за време фоликулогенезе излучује трансформишући фактор раста бета (енг. *transforming growth factor β- TGFβ*) који делује на ћелије око ње, што их подстиче на ослобађање актина, инхибина и Anti-Müllerov-ог хормона (енг. *Anti-Müllerian hormon- AMH*). Они делују на раст јајне ћелије, пролиферацију гранулоза ћелија и диференцијацију тека ћелија (28). Код жена *AMH* се ослобађа искључиво од стране гранулоза ћелије и то од 36. дана гестације, све до менопаузе. Код жена је *AMH* експримиран у растућим фоликулима, од њиховог раног развоја (примордијални фоликули) до одабира једног од њих за доминацију (антрални фоликул). Током фоликулогенезе *AMH* је кључан због своје инхибиторне улоге током почетне фазе раста примордијалних фоликула чији раст зависи од дејства *FSH*, што има утицај на смањење укупног броја растућих фоликула, а тиме и на потенцијално смањење квалитета јајних ћелија у њима. У недостатку *AMH*, јајници раније истроше примордијалне фоликуле јер долази до њихове преране активације (35, 36).

1.1.3. Оогенеза и мејоза

Упоредо са процесом фоликулогенезе одвија се процес **оогенезе и мејозе** током ког долази до сазревања јајне ћелије. Мејоза укључује две узастопне деобе: прву и другу мејотичку деобу, током којих од једне ћелије настају четири ћелије у овом случају једна секундарна ооцита и три полоците са по 23 хромозома (хаплоидан број) (Слика 4) (19, 37).

Диференцијацијом герминативних ћелија у оогоније започиње сазревање јајне ћелије које започиње пре рођења (слика 4) (19). Оогоније, са диплоидним бројем хромозома (2n), неколико се пута митотички поделе, а затим, у трећем месецу развоја приметна, неке од њих настављају своју диференцијацију у примарне ооците (38). До петог месеца развоја број оогонија расте и достиже свој максимум. У профазу прве мејотичке деобе улазе примарне ооците које су настале диференцијацијом оогонија до седмог месеца, а остале пропадају. Настале примарне ооците су окружене слојем фоликуларних ћелија и налазе се у примордијалном фоликулу (39). Примарне ооците садрже 46 двохроматидних, делимично кондензованих, хромозома (диплоидан број, 2n) смештене су у једра која се називају герминалне везикуле (енг. *Germinal vesicle- GV*) (19). До пубертета примарне ооците мирују у диплотену профазе I, односно до одабира једног од фоликула за доминацију, када примарна ооцита наставља свој развој. Застој у диплотену профазе прве мејотичке деобе назива се диктиотен (19). У пубертету се само неколико 15 до 20 примарних ооцита регрутује током сваког менструалног циклуса, а само једна примарна ооцита у доминантном фоликулу сазрева. Примарна ооцита завршава мејозу I и дели се на две ћерке ћелије: хаплоидну (n) секундарну ооциту и нефункционално поларно тело. Мејоза се не завршава у потпуности, већ се

поново зауставља у метафази II и завршава након успешне оплодње сперматозоидом када се формира и друго поларно тело (19, 40).



Слика 4. Мејоза

(Преузето са сајта и модификовано: <https://www.chegg.com/learn/biology/anatomy-physiology-in-biology/process-of-oogenesis>)

Завршетак мејотичке деобе јајне ћелије након застоја у метафази II под контролом је *Maturation promoting factor-α* (MPF). Високе концентрације MPF онемогућавају репликацију дезоксирибонуклеинске киселине (енг. *Deoxyribonucleic acid - DNA*) (41) у самој јајној ћелији. Осим наведених молекула, за завршетак мејотичке деобе и правилну оплодњу потребно је и правилно осцилирање јона калцијума: нижа концентрација јона калцијума доводи до почетка кортикалне реакције, а виша концентрација до наставка мејотичке деобе након застоја (42). У тренутку оплодње пораст унутарћелијске концентрације јона калцијума, сигнал је за почетак активације јајне ћелије односно за започињање низа биохемијских реакција које укључују егзоцитозу кортикалних гранула, наставак мејотичке деобе, репликацију DNA молекула и прву митотичку деобу насталог зигота (42). Другу мејотичку деобу јајна ћелија ће довршити само у случају оплодње (иначе ће пропасти у наредна 24 часа), а за то време ће се и прво поларно тело поделити.

Укупни број примарних ооцита након рођења износи око 700 000, до почетка пубертета остаје их око 400 000. Током репродуктивног доба жене мање од 500 примарних ооцита сазри, неке остају у профазу I све до менопаузе. Претпоставља се да је стадијум примарне ооците најотпорнији на евентуална оштећења узрокована

околним утицајима, али се учесталост хромозомских аномалија повећава са животним добом мајке, односно са повећањем времена које је ћелија провела у диктиотену. Паралелно са наведеним догађајима, током којих сазрева једро јајне ћелије, долази и до сазревања њене цитоплазме. Тај је процес мање дефинисан од саме мејозе, а укључује правилно смештање органела, синтезу протеина, пост-транслацијске модификације информационе рибонуклеинске киселине (енг. *messenger ribonucleic acid - mRNA*) накупљене током оогенезе (43).

1.2. Функције хормона јајника

Естрогени и прогестагени представљају два типа полних хормона који се луче у јајницима. Најважнији хормон међу естрогенима је **естрадиол**, а међу прогестанима **прогестерон**. Естрогени доминантно подстичу пролиферацију и раст специфичних ћелија, које су одговорне за развој већине секундарних сексуалних одлика жене. Прогестани су преваходно одговорни за коначну припрему материце за трудноћу и дојки за лактацију (44, 45). Естроген као и прогестерон су стероидни хормони који се синтетишу у јајницима, највећим делом из холестерола у крви, а у мањој мери и из ацетил-коензима А. При томе, обично први настају прогестерон и тестостерон, који се током фоликуларне фазе оваријалног циклуса највећим делом конвертују у естроген. Касније, током лутеинске фазе циклуса, излучује се много више прогестерона него што би могло бити конвертовано, те се велике количине овог хормона убацују у циркулишућу крв. У крви се излучује и вишак тестостерона (46, 47).

Код здраве жене ван периода трудноће, естроген се у значајним количинама лучи само у јајницима, а у малим количинама и у кори надбубрежних жлезда. Током трудноће, постељица лучи велике количине естрогена. Естрогени се транспортују кроз крв углавном везани за албумине плазме или за њих специфичне глобулине. Ове везе су довољно слабе и омогућавају стални прелазак естрогена у ткива у периоду од око 30 минута. Главно дејство естрогена је изазивање ћелијске пролиферације и раста у ткивима полних органа и другим ткивима која су повезана са репродукцијом. Нарочито је важан утицај естрогена на материцу, спољашње полне органе жене, јајоводе, дојке, скелет, на депоновање протеина и масти у телу, на кожу, на метаболизам и електролитни баланс (задржавање натријума и воде) (46, 47).

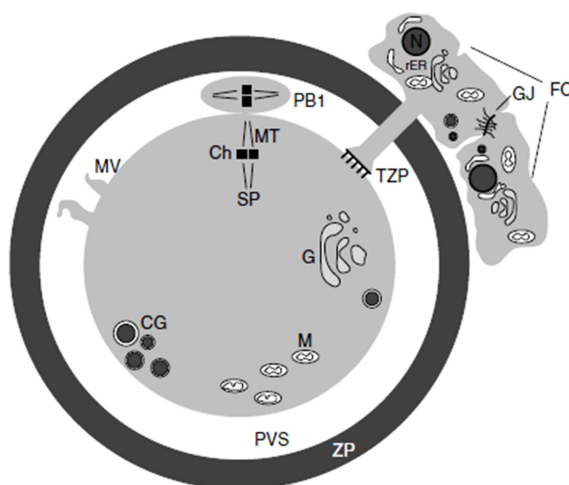
У јајницима се продукују два прогестина: прогестерон и 17-алфа-хидроксипрогестерон, који углавном имају исто дејство. Због неупоредиво веће количине излученог прогестерона, он се сматра јединим практично важним прогестином. Код жене која није трудна значајне количине прогестерона луче се из жутог тела само у другој половини оваријалног циклуса. Током трудноће велике количине прогестерона лучи постељица, нарочито након четвртог месеца гестације. И прогестерон се транспортује путем крви везан за албумине плазме или за специфичне глобулине. Ова веза је слаба и омогућава константан прелазак прогестерона у ткива. Најважнија улога прогестерона је подстицање секреторних промена у ендометријуму материце у току друге половине менструалног циклуса жене, када се материца припрема за имплантацију оплођене јајне ћелије. Поред овога, прогестерон смањује фреквенцију и интензитет контракција материце и тако спречава избацивање оплођене јајне ћелије. Прогестерон такође подстиче појачану секрецију из мукозног омотача јајовода. Она је неопходна за исхрану оплођене јајне ћелије, која се дели у току проласка кроз јајовод пре имплантације. У дојкама прогестерон подстиче развој лобулуса и алвеола, доводи до

пролиферације и повећања алвеола, при чему оне попримају способност секреције. Међутим, прогестерон не изазива лучење млека из алвеола, јер се оно лучи тек када су припремљене дојке стимулисане пролактином из аденохипофизе (46, 47, 48).

1.3. Грађа јајне ћелије

Једро, цитоплазма с органелама, ћелијска мембрана – оолема, перивителински простор (енг. *Perivitelline space- PVS*) и зона пелуцида (енг. *Zona pellucida-ZP*) су основни делови јајне ћелије (Слика 5) (49).

Једро зреле јајне ћелије садржи хаплоидан (n) број хромозома. Оплођена јајна ћелија са диплоидним ($2n$) бројем хромозома настаје након спајања са сперматозоидом. У богатој цитоплазми се налази једро и низ компоненти неопходних за наставак раста и развоја ћелије, као што су протеини, рибозоми, транспортна рибонуклеинска киселина (енг. *Transport ribonucleic acid - tRNA*) и разни заштитни молекули (49, 50, 51). У цитоплазми јајне ћелије смештене су и остале ћелијске органеле: митохондрије, лизозоми, ендоплазматични ретикулум, микрофиламенти и микротубули.



Слика 5. Грађа јајне ћелије

(*ZP*- зона пелуцида, *PVS*-перивителински простор, *PB1*- прво поларно тело, *MV*- микровили, *SP*- деобно вретено, *MT*- микротубули, *Ch*- хромозоми, *G*- Голџијев комплекс, *CG*- кортикалне грануле, *M*- митохондрије, *FC*- фоликуларне ћелије *GJ*-пукотински спој између две фоликуларне ћелије, *rER*- гранулирани ендоплазматични ретикулум, *TZP*)

(модификовано из Elder и Dale 2011)

Ћелијском мембраном или оолемом је обавијена цитоплазма. Уз оолему у концентричним слојевима су распоређена кортикалне грануле које уствари представљају секреторне грануле. Њихова најважнија улога је превенција полиспермије (52). Кортикалне грануле се, непосредно након оплодње, током тзв. кортикалне реакције,

стапају са ћелијском мембраном јајне ћелије. У току кортикалне реакције излучују свој садржај у ванћелијски матрикс који укључује *PVS*, *ZP* и ћелије кумулуса. При том долази до промена у целом ванћелијском матриксу, а посебно у *ZP*, која постаје непропусна за сперматозоиде (53).

Уско уз оолему, са њене спољне стране, налази се *PVS*. Синтетише га сама ооцита током оогенезе (54). Након избацивања првог поларног тела (енг. *Polar body-PB*) постаје видљив *PVS*, повећан око самог поларног тела. Такав изглед задржава до тренутка оплодње. Док год је присутна *ZP*, присутан је и *PVS*, односно до настанка бластоцисте непосредно пре имплантације. У незрелој јајној ћелији, *PVS* је врло мали и испуњава га углавном фоликуларна течност, а након избацивања *PB* долази до експанзије ћелија кумулуса. Након оплодње, *PVS* се значајно повећава, започиње кортикална реакција, а садржај кортикалних гранула отпушта се у *PVS* при чему долази до промена у пропусности *ZP* (53).

Око *PVS* налази се *ZP*, гликопротеинска опна грађена од влакана и гранула уроњених у матрикс (55). У развоју јајне ћелије *ZP* има вишеструке улоге, како што је заштита током раста и транспорта, у оплодњи током везивања сперматозоида за јајну ћелију (индукује акрозомске реакције у сперматозоидима који су везани за *ZP* и у спречавању полиспермије), у развоју бластоцисте и спречавању њене преране имплантације. Зону пелуциду чине четири главна гликопротеина *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* и *ZP4*. У индукцији акрозомске реакције везаних сперматозоида укључени су *ZP1*, *ZP3* и *ZP4*, док разградња *ZP2* након оплодње спречава полиспермију (53).

1.4. Фоликул и фоликуларна течност као микросредина јајне ћелије

Микросредину јајне ћелије чине компоненте које су у непосредном контакту са њом у току трајања њеног раста и развоја (34). Ћелије кумулуса су у уској вези с јајном ћелијом и са њом стварају комплекс кумулуса и јајне ћелије (енг. *cumulus oocyte complex- COC*). Цео *COC* је до овулације смештен унутар фоликула који прати развој јајне ћелије, а испуњен је течношћу богатом молекулима неопходним за развој и функцију јајне ћелије. Та фоликуларна течност је још једна од кључних компоненти микросредине јајне ћелије.

Фоликуларна течност се састоји од компоненти крвотока, који циркулише капиларима присутним у подручју зида фоликула и компоненти које луче ћелијски слојеви који су унутар фоликула, посебно ћелије гранулозе (56, 67). У тренутку природне овулације, велика количина фоликуларне течности се избацује са јајном ћелијом према материци (58). Ова течност је првенствено састављена од протеина и стероидних хормона, укључујући *FSH*, *LH*, хормон раста (енг. *growth hormone- GH*), *hCG*, прогестерон и естрадиол. Присутни су и цитокини; ензими; антикоагуланси; електролити; реактивне врсте кисеоника (енг. *reactive oxygen species- ROS*); ензимски и неензимски антиоксиданси, укључујући витамин Е, витамин Д, каталазу и мелатонин; фактори раста као што је епидермални фактор раста (енг. *epidermal growth factor- EFG*), фактор раста сличан *EFG*-у и трансформирајући фактор раста алфа (енг. *transforming growth factor alpha- TGF-α*); метаболити као што су аминокиселине и липиди који се акумулирају унутар јајне ћелије, што помаже њеној диференцијацији; и масне киселине (56, 59, 60).

Пре овулације, ооцита се налази у диктиотену, застоју у профазу прве мејотичке дебе. У том је стању одржавају високе количине цикличког аденозин монофосфата (енг. *cyclic adenosine monophosphate- cAMP*). Наглим скоком нивоа *LH* у природном циклусу, или давањем *hCG*-а у циклусима *БМПО*, прекида се застој и јајна ћелија наставља мејозу, а истовремено долази до експанзије *СОС*-а. Експанзија или ширење *СОС*-а догађа се када се хијалуронска киселина, коју излучују ћелије кумулуса под утицајем гонадотропних хормона, хидратизује па се размаци између ћелија кумулуса повећају. Ширење кумулуса у преовулацијском фоликулу неопходно је за процес овулације.

Метаболизам јајне ћелије такође је под утицајем фактора из микросредине која окружује јајну ћелију. Један од главних метаболичких путева ћелије јесте метаболизам глукозе. Јајна ћелија нема велики капацитет за метаболизам глукозе због ниске активности фосфофруктокиназе, већ то одрађују ћелије кумулуса код којих је активност фосфофруктокиназе доста већа, а настали пируват, лактат или никотинамид аденин динуклеотид хидрокси фосфат (енг. *nikotinamid adenin dinukleotid hidroxi fosfat- NADPH*) се транспортују у јајну ћелију као извор енергије (61). Јајна ћелија учествује у наведеним догађајима тако што подстиче експресију гена за гликолизу у ћелијама кумулуса. Анаеробна гликолиза је главни пут метаболизма глукозе у фоликулима јајника. Унутар *СОС*-а, одређен део глукозе улази у други сигнални пут који контролише оксидативни статус јајне ћелије, док додатна глукоза служи као супстрат за производњу хијалуронске киселине неопходне за експанзију кумулуса и за ћелијску сигнализацију. Евентуални вишак глукозе води ка производњи фруктозе и сорбитола који негативно утичу на квалитет јајне ћелије (61).

Што се тиче метаболизма липда, у ооцити се током овулације појачава оксидација слободних масних киселина као бољи извор аденозин трифосфата (енг. *adenosine tri phosphate - ATP*). У јајним ћелијама липиди се складиште као триацилглицероли (масне киселине естрификоване у глицерол) у капљицама липида, док слободне масне киселине могу бити локализоване и унутар цитоплазме. Капљице липида заједно са митохондријама стварају такозване „метаболичке јединице“. Слободне масне киселине улазе у митохондрије где учествују у производњи *ATP*-а бета-оксидацијом. У присуству *LH* или *hCG*, настаје кортизол, који подстиче овај метаболички пут липида као извор енергије за наставак мејотичке деобе, оплодњу и рану ембриогенезу. Поред повећаног коришћења глукозе, кисеоника и пирувата током свог развоја, јајна ћелија у интеракцији са ћелијама кумулуса регулише транспорт аминокиселина и холестерола нужних за остале ћелијске процесе (61).

У потрази за бољим показатељима квалитета јајне ћелије све се више истражују молекули укључени у ћелијску сигнализацију и метаболизам, а који су саставни део фоликуларне течности која окружује јајну ћелију. Јајна ћелија је у сталној интеракцији са соматским ћелијама које је окружују па и сама излучује одређене компоненте које одређују њен развој (34).

1.4.1. Естрадиол, прогестерон, тестостерон, FSH

Естрадиол, прогестерон и тестостерон су главни стероидни хормони који играју битну улогу током фоликуларне и лутеалне фазе менструалног циклуса. Упркос томе, у литератури још увек постоје недоследности у вези са концентрацијама естрадиола и

других стероидних хормона у фоликуларној течности. Већи нивои естрадиола и прогестерона нађени су у фоликулима из којих су добијене јајне ћелије са већом стопом оплодње. Ова опажања, међутим, нису потврђена другим студијама, већ је доказано да квалитет ембриона није био у вези са нивоима фоликуларног естрадиола и прогестерона. С друге стране, повишени нивои естрадиола и прогестерона у фоликуларној течности били су повезани са повећаном шансом за трудноћом (45).

Ниже концентрације прогестерона и више концентрације тестостерона измерене су у фоликуларној течности која је садржала ооците са герминалом везикулом (GV) у поређењу са фоликуларном течношћу која је садржала МП ооците. Жене које су примеле терапију за стимулацију овулације имале су ниже концентрације АМН, тестостерона, андростендиона, естрадиола и LH у фоликуларној течности, али виши ниво FSH, у односу на жене које пролазе кроз природни циклус, што сугерише да стимулација овулације значајно мења хормонску средину фоликуларне течности (62).

1.4.2. АМХ и витамин Д

Током 2014. године спроведена је мета анализа која је показала слабу позитивну корелацију АМН са успехом поступака БМПО (63). Такође је утврђена и повезаност АМН с квалитетом ооците. Спроведена истраживања показала су да је концентрација АМН у фоликуларној течности у позитивној корелацији са фертилизацијским и имплантацијским потенцијалом ооците и предлажу одређивање концентрације АМН у фоликуларној течности и серуму како би се предвидела успешност оплодње и имплантанцијски потенцијал ембриона (63, 64). У многобројним истраживањима добијени су различити резултати: једни су показали да су високе концентрације АМН у фоликуларној течности повезане са више имплантираних ембриона и већим бројем трудноћа (64), док су други утврдили да је експресија АМН у ћелијама кумулуса, као и концентрација у фоликуларној течности, значајно већа у фоликулима са лошијим јајним ћелијама (65).

Витамин Д (калциферол) припада групи стероидних хормона, а два најважнија облика у којима се јавља су витамин Д₂ (ергокалциферол) и витамин Д₃ (холекалциферол). Витамин Д₃ продукује се у кожи излагањем сунчевим зрацима, док се витамин Д₂ уноси у организам исхраном (66). Последњих пар година се све више указује на улогу витамина Д и његов значај у репродуктивном систему и репродуктивном успеху. Доказано је да дефицијенција витамина Д чешћа код инфертилних жена (67, 68). Parikh и сарадници су на основу улоге витамина Д у настанку стероида и повећању експресије и активности ароматазе а самим тим и повећању концентрације естрадиола, показали да витамин Д на тај начин утиче на број и квалитет ооцита (69). Промотор за АМН ген садржи витамин Д, па се претпоставља да витамин Д на тај начин регулише производњу АМН у култивисаним ћелијама фоликула јајника (70). Витамин Д је стога потенцијални регулатор концентрације АМН у крви. Витамин Д умањује експресију гена за АМН, умањује осетљивост гранулоза ћелија на АМН и супримира рецепторе за АМН, на тај начин спречава настанак синдрома полицистичних јајника (71). Мета анализа спроведена 2020. године показује да деловање витамина Д на АМН зависи од овулационог статуса жене. Код синдрома полицистичних јајника АМН је доста повишен, па додатно уношење витамина Д као суплемента побољшава фоликулогенезу и у складу је са доказима из бројних

клиничких испитивања који показују побољшане клиничке манифестације након примене витамина Д (72).

1.4.3. Интерлеукин 6

Интерлеукин 6 (енг. *interleucin 6- IL-6*) је плејотропни цитокин са вишеструким ефектима који могу варирати у зависности од физиолошког окружења. IL-6 промовише пролиферацију Т ћелија, диференцијацију Б ћелија и пролиферацију кератиноцита. Такође може регулисати разне друге функције, укључујући метаболизам глукозе, метаболизам липида и резистенцију на инсулин. IL-6 такође делује на ендокрини и нервни систем (73, 74). IL-6 такође може играти важну улогу у развоју фоликула. Што се тиче фоликулогенезе, цитокини регулишу пролиферацију или диференцијацију ћелија, преживљавање или атрезију фоликула и сазревање јајних ћелија (75). Фоликуларна течност обезбеђује микроокружење за развој јајних ћелија (76), а IL-6 је нормалан састојак фоликуларне течности. Ниво IL-6 у фоликуларној течности је знатно већи него у серуму (77, 78).

Клиничке студије које су дизајниране како би се истражила потенцијална улога IL-6 у сазревању хуманих јајних ћелија и развоју ембриона, али до данас одговори нису коначни. Неке студије су показале да висок ниво IL-6 у фоликуларној течности има позитиван ефекат на сазревање јајних ћелија (79, 80). Високи ниво IL-6 у култури у којој се ембриони развијају били су повезани са повећаном стопом клиничких трудноћа и имплантацијом ембриона (78, 81, 82, 83). Међутим, друге студије су пронашле супротне резултате. Виши ниво IL-6 корелирао је са лошијим квалитетом ембриона и постојала је мања шанса за развојем трудноће (84, 85, 86). Закључено је да IL-6 може ометати развој јајних ћелија (87). Такође, нека истраживања сугеришу да IL-6 није утицао на клиничку стопу трудноћа, као ни на квалитет јајних ћелија (88, 89, 90).

1.4.4. Биоелементи (калијум, натријум, магнезијум, калцијум, гвожђе)

Поред хормона и витамина велики утицај на квалитет јајне ћелије имају и биоелементи (91). Постоји посебан интерес за изучавање утицаја недостатка биоелемената на физиолошке функције, посебно репродукцију.

Према Silberstein и сар. (2009) најчешћи елементи који се налазе у фоликуларној течности су калцијум (*Ca*) и магнезијум (*Mg*), затим бакар (*Cu*), цинк (*Zn*), гвожђе (*Fe*), хром (*Cr*), рубидијум (*Rb*), али закључено је да концентрација ових елемената не утиче на зрелост ооцита (92, 93).

Натријум и калијум спадају у групу метала и имају слична хемијска својства. Натријум-калијумова пумпа је одговорна за примарни активни транспорт јона кроз ћелијску мембрану који се крећу из средине са мањом у средину са већом концентрацијом помоћу молекула носача и уз потрошњу енергије. Овај процес омогућава да јони натријума активно излазе из ћелије, а јони калијума улазе у ћелију и то супротно концентрационом градијенту — натријума има више ван ћелије него у њој, а калијума обрнуто. Протеини носачи раде као пумпе и као ензими *ATP* јер катализују

разлагање *ATP*-а. Разлагањем *ATP*-а на аденозин дифосфат (енг. *adenosine diphosphate - ADP*) и неоргански фосфат, раскида се фосфоанхидридна веза богата енергијом чиме се обезбеђује енергија неопходна за овај транспорт. Натријум-калијумова пумпа има главну улогу у стварању мембранског потенцијала ћелија (94).

Магнезијум обезбеђује стабилизацију *DNA*, *RNA* и рибозома, такође активира и око 300 ензима, укључујући и ензиме у метаболизму енергије и производњи *ROS*-а (95).

Већ дуго је познато да је калцијум незаменљиви сигнал за фертилизацију код сисара. У току спајања мембрана сперматозоида и јајне ћелије, први интрацелуларни сигнални пут је уочен као серија ниско фреквентних осцилација и велики пораст слободних јона калцијума у цитоплазми. На основу овога може се претпоставити да би одсуство или ниска концентрација калцијума у време фертилизације могла довести до неуспешног оплођења (96).

Гвожђе је од виталног значаја за синтезу нуклеинских киселина и протеина, транспорт електрона и ћелијско дисање, развој и диференцијацију. Гвожђе је повезано са великим бројем редокс реакција катализираних цитохромима, чиме утиче на производњу енергије, метаболизам лекова и хормона, и ширење и активирање одбрамбених система путем никотинамид аденин динуклеотид фосфат (*NADP*) оксидазе (91).

1.4.5. Ензими

Промене концентрације метаболичких ензима који се налазе у фоликуларној течности односе се на процес фоликулогенезе и на основу њихове концентрације могу да се тумаче догађаји везани за сазревање фоликула и јајних ћелија. Лактат дехидрогеназа (енг. *Lactate dehydrogenase - LDH*) је метаболички ензим, ослобађа се због ћелијске смрти, па је повећана активност *LDH* примећена код некрозе ткива. У фоликуларној течности повећана активност *LDH* може указивати на рану дегенерацију фоликула. Satish и сарадници су закључили да се активност *LDH* повећавала хронолошки са годинама пацијената, као и са величином (пречником) фоликула, такође закључили су да већа активност *LDH* може да буде повезана са фрагментацијом ембриона (97).

Аспартат аминотрансфераза (енг. *Aspartate aminotransferase - AST*) и аланин аминотрансфераза (енг. *Alanine Aminotransferase - ALT*) су важни ензими у метаболизму аминокиселина. *ALT* катализује реверзибилне реакције биотрансформације између аланина и глутаминске киселине, док *AST* катализује реверзибилне реакције биотрансформације између аспарагинске киселине и глутаминске киселине. Највећа концентрација ових ензима у фоликуларној течности малих фоликула сугерише да је глутаминска киселина много важнија током ране фазе раста фоликула. Већа концентрација *AST* и *ALT* у малим фоликулима и фоликулима средње величине такође може указивати на стадијум ране фоликуларне атрезије, јер када је ткиво оштећено долази до повећања концентрације трансфераза (98).

Алкална фосфатаза (енг. *Alkaline phosphatase - ALP*) је лизозомални ензим који катализује различите реакције у телу, укључујући активни транспорт фосфата кроз ћелијску мембрану, синтеза протеина и промет *DNA* у једру (99). Активност *ALP* се повећава услед физиолошких појава, али и патолошких појава, као што су упала и

пролиферација ћелија. Ензими фосфатазе учествују и у расту фоликула, али и у атрезии фоликула. Већа активност *ALP* у почетним фазама фоликулогенезе може бити и због присуства веће концентрације прогестерона и андрогена у малим фоликулима. Смањена активност алкалне фосфатазе у фоликуларној течности већих фоликула је због промене фоликуларног хормонског статуса саме фоликуларне течности, јер са развојем фоликула доминира естроген. Такође, повишена активност *ALP* у фоликуларној течности малих антралних фоликула може да ограничи њихово реаговање на стимулацију гонадотропином (100).

1.5. Биомедицински потпомогнута оплодња

Биомедицински потпомогнута оплодња је процес који обухвата неколико фаза:

- **Прва фаза процеса је контролисана оваријална хиперстимулација** (енг. *controlled ovarian hyperstimulation - COH*). У циљу добијања што већег (али не и превеликог) броја јајних ћелија врши се хормонска стимулација жене употребом различитих протокола стимулације овулације.
- **Друга фаза је колекција јајних ћелија**. Данас се јајне ћелије најчешће узимају аспирационом методом, трансвагиналним путем под контролом ултразвука.
- **Трећа фаза подразумева процес оплодње јајне ћелије**. У овој фази оплодња се дешава у лабораторијским условима. Класична *In vitro* оплодња (енг. *In vitro fertilization - IVF*) је када се оплодња догоди спонтано, али у контролисаним условима. Фертилизација се проверава након 18-20 часова. Интрацитоплазматска инјекција сперматозоида (енг. *intracytoplasmic sperm injection - ICSI*) варијанта је када ембриолог микроманипулаторима и микроинјектором убризгава одабрани сперматозоид у јајну ћелију. У овом случају фертилизација се проверава након 14-16 часова, а 24 часа касније се проверава да ли је дошло до адекватне деобе.
- **Четврта фаза је култивација ембриона**. Ембриони се култивишу у медијумима одобреним за *IVF* у инкубаторима на 37°C где је влажност 98% и ниво CO₂ 6%, O₂ 5%, а остатак је азот (89%)
- **Пета фаза обухвата убацивање ембриона у материцу, односно ембриотрансфер (ET) 72 или 120 часова након оплодње**. Ово је последња фаза процеса вантелесне оплодње. Ембрион се убацује у материцу путем специјалног катетера и увек се убацује најмање један, а највише три ембриона да би се повећала вероватноћа имплантације ембриона.

1.5.1. Контролисана оваријална хиперстимулација

Под контролисаном оваријалном хиперстимулацијом - *COH* се подразумева примена лекова гонадотропина као што су хумани менопаузални гонадотропин (енг. *Human menopausal gonadotropin - HMG*), рекомбинантни фоликулостимулирајући хормон (енг. *recombinant follicle stimulating hormone- rFSH*), рекомбинантни лутеинизирајући хормон (енг. *Recombinant luteinizing hormone- rLH*) и високо пречишћени гонадотропини из урина (енг. *Highly purified gonadotrophins*) који имају за циљ да у јајнику жене подстакну раст више фоликула (101). Да би стимулација јајника применом егзогених гонадотропина била адекватна потребно је прво поништити дејство *GnRH*. Најчешће се примењују два протокола за контролисану оваријалну хиперстимулацију и то: дуги протокол са *GnRH* агонистима и кратки протокол са *GnRH* антагонистима.

Дуг протокол започиње 21. дана менструалног циклуса, који претходи циклусу са *COH* применом *GnRH* аналога. Примена *GnRH* аналога има за циљ десензибилизацију хипоталамуса и спречавање хипофизе да продукује ендogene гонадотропине (*FSH* и *LH*) и омогућава да се на тај начин комплетно искључи утицај хипофизе на јајник. Након што је потврђена супресија, започиње се са ординирањем егзогених гонадотропина (2-3 дана менструалног циклуса) (102).

Код кратког протокола користе се *GnRH* антагонисти који изазивају моменталну блокаду *GnRH* рецептора и брз пад *LH* и *FSH* (103). Код кратког протокола *COH*, примена егзогених гонадотропина започиње другог или трећег дана менструалног циклуса. Увођење *GnRH* антагониста је обично после петог дана стимулације, али се тачан дан примене одређује на основу ултразвучног налаза и нивоа естрадиола у серуму (104). Смисао увођења *GnRH* антагониста и *GnRH* агониста, у протоколима *COH* је спречавање превременог скока *LH* и започињања процеса овулације и лутеинизације, чиме би била угрожена стимулација и комплетна *БМПО* процедура.

У кратком протоколу, са применом *GnRH* агониста започиње се првог дана менструације, при чему се у почетку користи њихов стимулативни ефекат на ендogenous продукцију гонадотропина који је последица пражњења депоа ендогених гонадотропина, а потом се од трећег (105) или петог дана циклуса ординирају гонадотропини (106). Оба лека се дају до завршне инјекције.

Код ултракратког протокола са *GnRH* агонистима и антагонистима, *GnRH* агонисти се користе прва три дана од почетка циклуса, а гонадотропини од трећег дана. *GnRH* антагонисти се ординирају, као и код кратког протокола, од дана када је ултразвучно верификован фоликул већи од 14 mm закључно са даном завршне инјекције (107, 108).

Након неколико дана од започињања стимулације, без обзира на примењени протокол стимулације започиње се ултразвучно праћење, тј. одређивање броја и величине фоликула, дебљине и квалитета ендометријума, као и одређивање вредности естрадиола у крви. Након регистрованог адекватног пораста фоликула, а под тим се подразумева присуство једног или више фоликула величине 18 и више милиметара и адекватног пораста естрадиола који корелира са бројем водећих фоликула, даје се завршна инјекција, односно *hCG*-а или *rLH*-а која имитира *LH* у природном циклусу и изазива матурацију јајних ћелија. Њиховом применом започиње сазревање јајних ћелија

(прелазак јајне ћелије из метафазе I у метафазу II мејотичке деобе, да би се након 34-36 часа након апликације *hCG* -а или *rLH*-а радила аспирација јајних ћелија.

1.5.2. Аспирација јајних ћелија

Аспирација јајних ћелија је хируршка интервенција која се ради трансвагинално под контролом ултразвука, у краткотрајној интравенској анестезији. У току те интервенције, аспирира се фоликуларна течност из фоликула, помоћу игле која је причвршћена за вагиналну ултразвучну сонду, уз коришћење специјалне вакум пумпе за аспирацију јајних ћелија. У аспирираној фоликуларној течности ембриолог врши идентификацију јајних ћелија уз помоћ стерео микроскопа смештеног у ламинарној комори.

1.5.3. Оплодња јајних ћелија и култивација ембриона

Након завршене аспирације јајних ћелија процењује се квалитет јајних ћелија. Јајне ћелије адекватне за оплодњу истог дана се оплођавају једном од две постојеће методе. Конвенционални *IVF* подразумева да обрађени сперматозоиди морају сами да оплоде јајну ћелију, док *ICSI* метода подразумева да ембриолог прво очисти јајну ћелију од ћелија кумулуса и да након тога под инвертним микроскопом опремљеним микроманипулатором, помоћу специјалних микроманипулационих пипета, убаци имобилисани сперматозоид у цитоплазму јајне ћелије (109). Након 16 - 20 часова проверава се да ли је дошло до оплодње. Потом се наредних дана (максимално пет дана од аспирације јајних ћелија) ембриони култивишу уз свакодневну проверу деобе. У зависности од квалитета ембриона, ембриотрансфер се обавља трећег или петог дана од аспирације јајних ћелија. На дан ембриотрансфера, ембриолог обавља завршну процену квалитета ембриона и најбоље ембрионе припрема за ембриотрансфер. У зависности од законске регулативе, а и старости пацијенткиње, ембриотрансфер се ради са 1, 2 или 3. По нашем Закону о *БМПО*, дозвољено је урадити ембриотрансфер са максимално 3 ембриона.

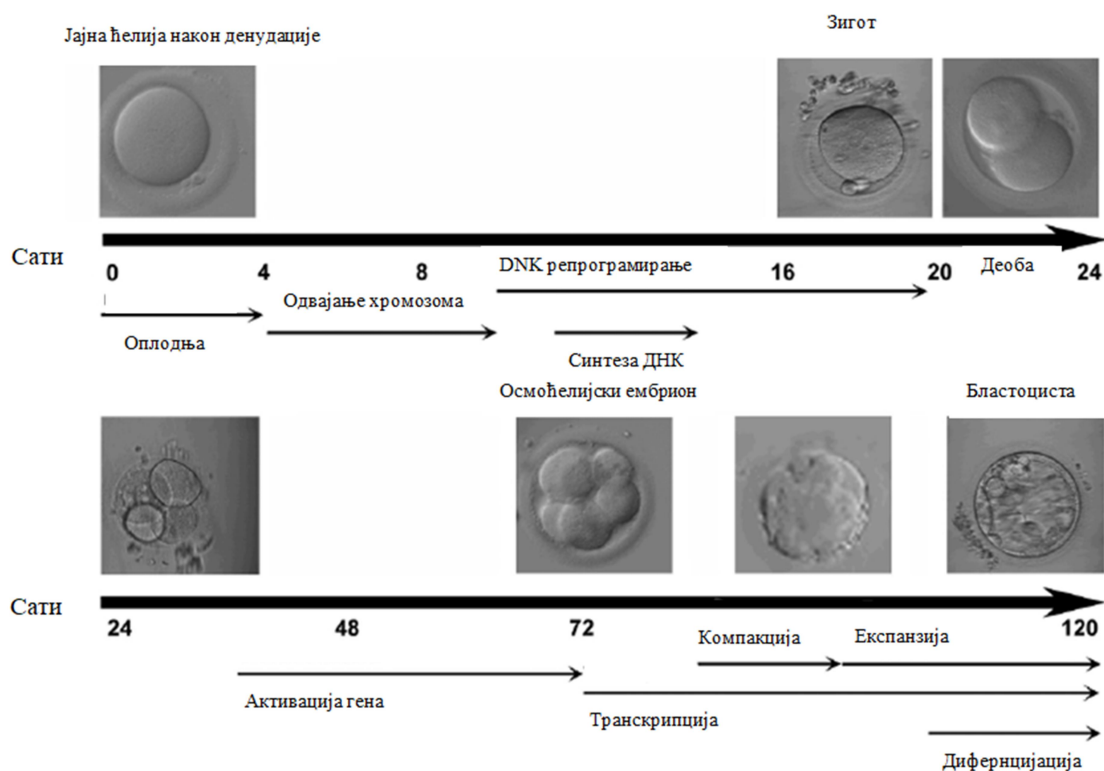
1.5.4. Ембриотрансфер

Ембриотрансфер је завршна фаза *IVF* у којој се у материцу жене убацују изабрани ембриони. Ово је веома осетљива процедура која мора бити урађена веома пажљиво, како не би дошло до повређивања ембриона, ендометријума и/или провоцирања контракција материце. Изводи се на тај начин што гинеколог ставља спекулум у вагину и припрема грлић материце, након чега ембриолог катетером за ембриотрансфер узима одабране ембрионе из медијума и предаје га гинекологу, који потом кроз цервикални канал, уводи катетер за ембриотрансфер у материцу и адекватно га позиционира под контролом ултразвука, а потом ембриолог истисне ембрионе (110).

1.6. Морфологија јајне ћелије, зигота и ембриона под микроскопом

Информацију на ком ступњу развоја је јајна ћелија и да ли може да се искористи за оплодњу или не, пружају морфолошке карактеристике јајне ћелије које су уочљиве под инвертним микроскопом (49).

Морфолошка процена јајних ћелија започиње приликом колекције јајних ћелија посматрањем ћелија кумулуса и корона ћелија. Код зрелих јајних ћелија тај слој ћелија требало би да изгледа као проширен слuzни слој, захваљујући активном излучивању молекула хијалуронске киселине које се налази између ћелија кумулуса и доводи до њиховог раздвајања. Код припреме ћелија за *ICSI*, читав тај слој ћелија се уклања, ради боље видљивости јајне ћелије и боље морфолошке процене (49). Након оплодње једном од метода (*IVF* или *ICSI*) прати се раст и развој зигота, односно ембриона. На Слици 6 је хронолошки приказано шта се дешава са јајном ћелијом, односно зиготом, односно ембрионом и како се те промене виде под инвертним микроскопом.

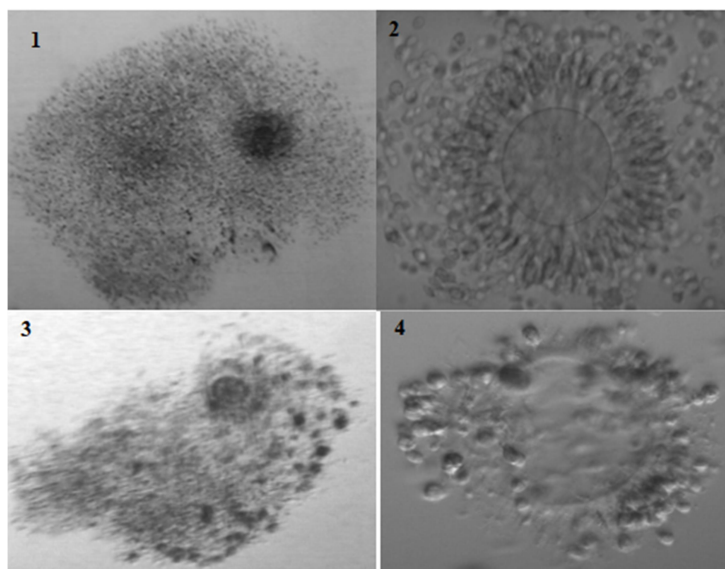


Слика 6. Рани развој људског ембриона по сатима до фазе бластоцисте (модификовано из Elder и Dale 2011)

1.6.1. Јајна ћелија (0. дан)

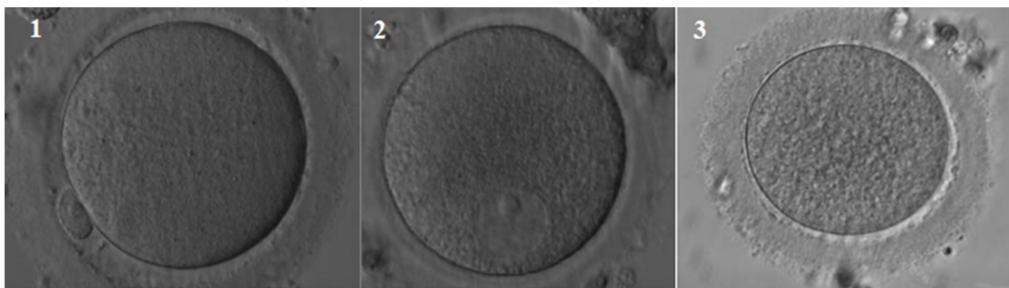
До развоја јајних ћелија различитог квалитета доводи контролисана хиперстимулација јајника, којој су подвргнуте жене укључене у поступке *IVF*. Процена квалитета и зрелости јајне ћелије заснива се на процени изгледа *COC*-а (Слика 7), стадијума зрелости једра, морфологије цитоплазме и изгледа екстрацитоплазматских структура након отклањања кумулуса. Идеално време за процену стадијума зрелости јајне ћелије је након уклањања ћелија кумулуса, а пре саме оплодње (49).

Јајна ћелија се сматра нуклеарно зрелом када се налази у метафази друге мејотичке деобе (МII), односно када је прво *PB* видљиво у *PVS*-у што се лако уочава под инвертним микроскопом (Слика 8). Уколико ћелија није зрела, односно уколико се налази у профази I, унутар цитоплазме ће бити видљива *GV* (Слика 8). Уколико *GV* није видљива, а не уочава се ни *PB*, ћелија се класификује као МI (Слика 8) (49).



Слика 7. Комплекс *COC*

1. Комплекс кумулуса и ооцита; 2. Зрео комплекс кумулуса и ооците са видљивим првим поларним телом; 3. Комплекс кумулуса и ооците са јасним црним мрљама које указују на знаке лутеинизације; 4. Празна зона пелуцида (модификовано из Elder и Dale 2011)

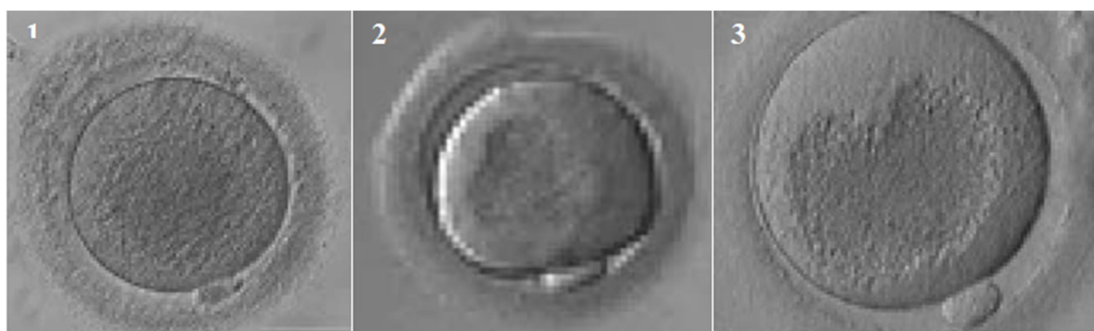


Слика 8. Јајна ћелија након денудације

1. МII ћелија са јасно видљивим *PB* у *PVS*- у; 2. Ћелија у профази I, унутар цитоплазме јасно видљива *GV*; 3. МI ћелија, није видљиво *PB*, а ни *GV* (модификовано из Rienzi и сар, 2012)

Осим карактеристика једра, треба разматрати и изглед осталих **цитоплазматских структура** (гранулација цитоплазме (Слика 9), појава глатког ендоплазматског ретикулума (Слика 10), присутност вакуола (Слика 11)) и **екстрацитоплазматских структура** (промене у *ZP* (Слика 12), величина и изглед *PVS* (Слика 13), морфологија *PB* (Слика 14 и 15)) све ово може указивати на нарушени развојни и имплантацијски потенцијал будућег ембриона (49).

Преимплантациони развој јајне ћелије зависи од величине и броја абнормалности, јер свака промена у цитоплазми потенцијално води ка поремећају њене функције (49). Нормалним се сматра ако у цитоплазми постоји блага хетерогеност и умерена гранулација (Слика 9). Показатељ слабијег квалитета јајне ћелије представља појава разних инклузија и накупљања органела у виду тзв. кондензоване централизоване гранулације (Слика 9). Једна од најзначајнијих озбиљних абнормалности цитоплазме је појава глатког ендоплазматичног ретикулума (енг. *Smooth endoplasmic reticulum - sER*) и такве ћелије се искључују из поступка (Слика 10). Честа је појава вакуола различите величине. Постојање неколико мањих вакуола не сматра се значајним, али присуство вакуола већих од 14 μm може имати негативан утицај на оплодњу (Слика 11).

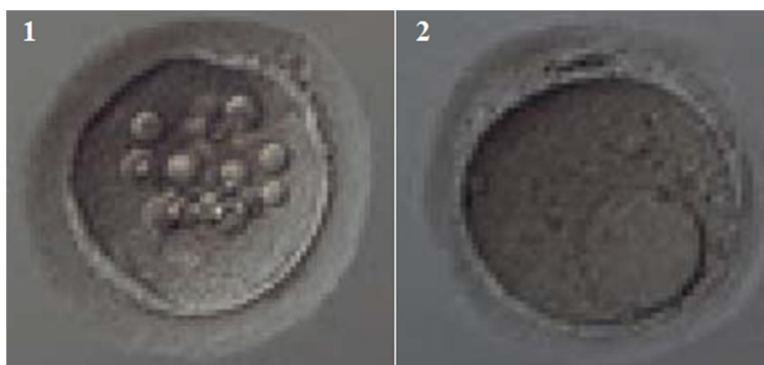


Слика 9. Гранулација цитоплазме јајне ћелије

1. МII јајна ћелија са зрнастом цитоплазмом, *ZP* је такође абнормална са израженим разликама у дебљини; 2. МII јајна ћелија са централно лоцираним зрнастим подручјем које формирају органеле које се групишу у цитоплазми, *ZP* има неправилан облик; 3. МII јајна ћелија која садржи велику централно лоцирану гранулу која заузима већину цитоплазме типично за груписање органела (модификовано из Rienzi и сар, 2012)

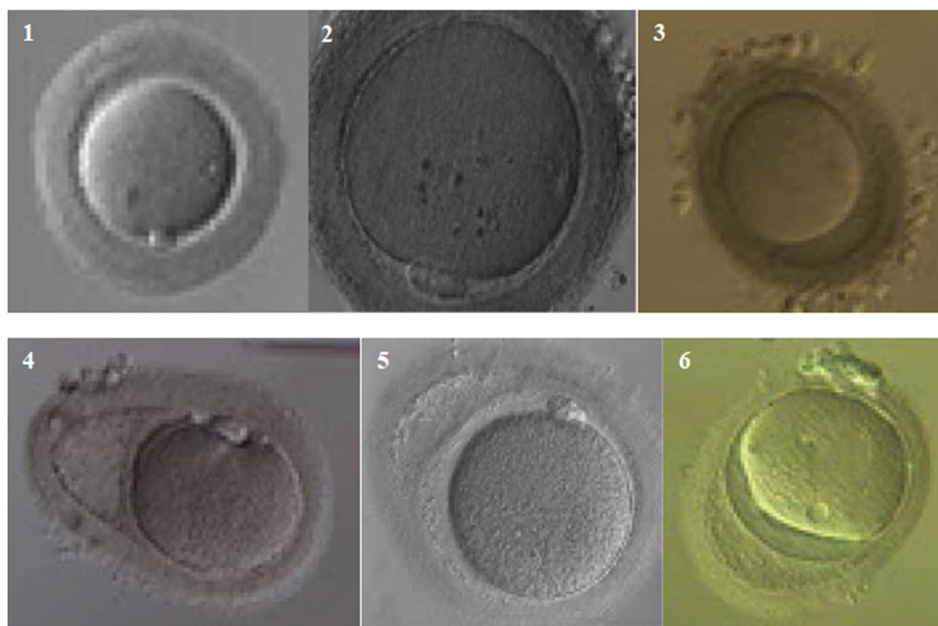


Слика 10. Глатки ендоплазматични ретикулум у цитоплазми јајне ћелије
 1. МП јајна ћелија која у цитоплазми има и *sER*; 2. МП јајна ћелија која у цитоплазми има и *sER*, али и фрагментисано *PB* (модификовано из Rienzi и cap, 2012)



Слика 11. Вакуоле у цитоплазми јајне ћелије
 1. Више ваукола у цитоплазми МП јајне ћелије; 2. Једна велика вакуола у тамној зрнастој цитоплазми МП јајне ћелије (модификовано из Rienzi и cap, 2012)

Екстрацитоплазматске карактеристике укључују промене везане за *ZP*, *PVS* и *PB*. Све промене у изгледу и облику *ZP* могу бити последица секреције гликопротеина (Слика 12). Велики *PVS* уочава се у презрелим јајним ћелијама (Слика 13). Када је у питању *PB* треба обратити пажњу на величину (Слика 14) и на фрагментацију *PB* (Слика 15). Изразито велика *PB*, статистички су значајно повезана са врло лошом прогнозом (Слика 14).



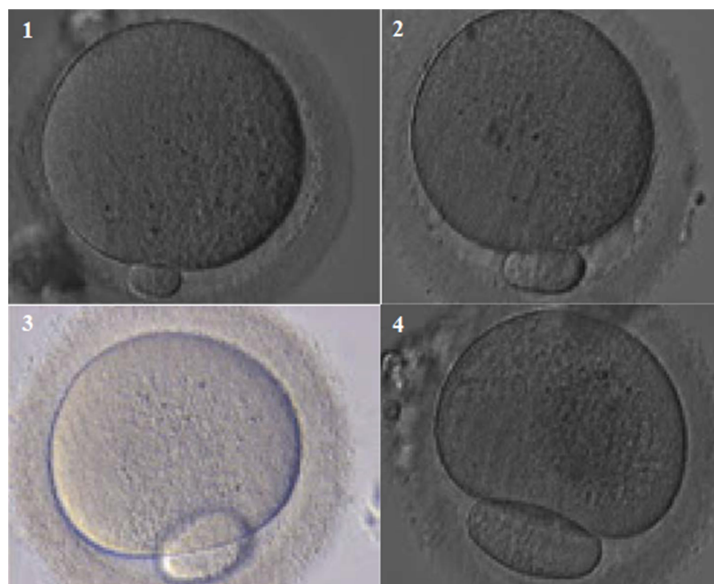
Слика 12. Промене јајне ћелије везане за *ZP*

1. МП јајна ћелија са дебелом и густом *ZP*; 2. МП јајна ћелија са дебелом и тамном *ZP* са инклузијама у цитоплазми; 3. МП јајна ћелија са дебелом и тамном *ZP* чија дебљина није равномерна; 4. Јајна ћелија са абнормално обликованом *ZP* која се под микроскопом види као да се дуплира или одваја од јајне ћелије која је неправилног облика; 5. Јајна ћелија са абнормално обликованом *ZP* која се под микроскопом види као да се дуплира или одваја од јајне ћелије која је правилног облика са видљивим *PB* у *PVS*; 6. Јајна ћелија са абнормално обликованом *ZP* која се под микроскопом види као да се дуплира или одваја од јајне ћелије која је изразито неправилног облика без видљивог *PB* у *PVS* (модификовано из Rienzi и сар, 2012)



Слика 13. Промене *PVS* јајне ћелије

1. Јајна ћелија са великим *PVS*-ом и цитоплазмом у којој постоји велика зрнаста површина; 2. Јајна ћелија са великим *PVS*-ом са неколико фагмената које су присутне у *PVS*-у; 3. Јајна ћелија са великим *PVS*-ом и гранулираном цитоплазмом (модификовано Rienzi и сар, 2012)



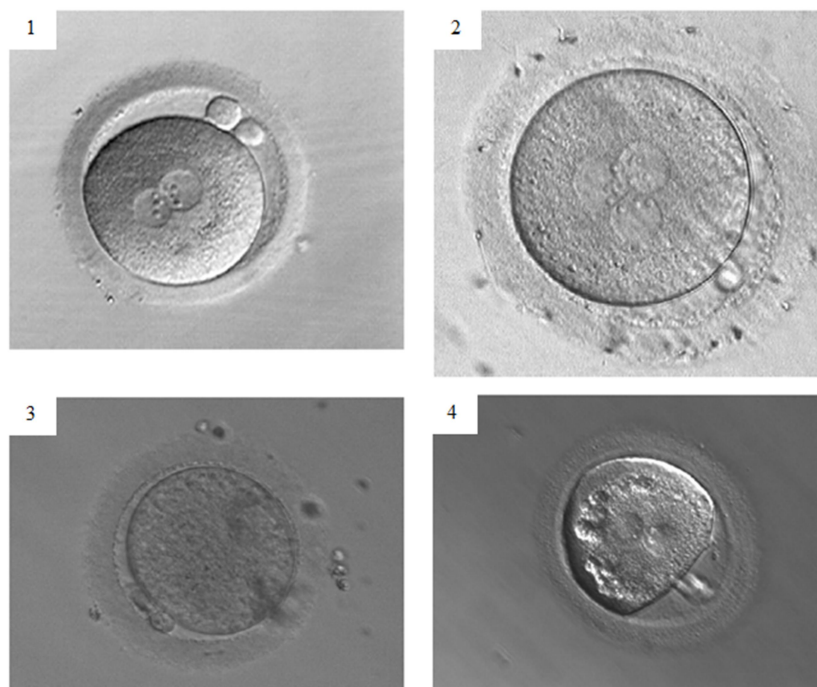
Слика 14. Промене у величини РВ

1. *МII* јајна ћелија са *PB* нормалне величине; 2. *МII* јајна ћелија са великим *PB*, које је 3-4 пута веће од нормалног; 3. *МII* јајна ћелија са великим *PB*, које је 5-6 пута веће од нормалног; 4. *МII* јајна ћелија са огромним *PB* (модификовано из Rienzi и сар, 2012)

Идеална јајна ћелија има облик правилне кугле, окружене равномерном *ZP*, са једноличном прозирном цитоплазмом, без инклузија и са *PB* прикладне величине (49). *ZP* не сме имати већа одступања у боји и дебљини, а у *PVS*-у се не смеју налазити инклузије и не сме бити екстремно повећан. *PB* такође не сме бити превелико. Што се тиче цитоплазме, она би требала бити хомогена, без накупљања органела и постојања *sER* дискова. Постојање неколико мањих вакуола не сматра се значајним. Добар *SOC* мора имати експандиран кумулус и зракасто распоређену корону (49).

1.6.2. Зигот (дан 1.)

Уколико се под инвертним микроскопом уочавају два пронуклеуса (енг. *pronucleus* - *PN*) и два *PB* дошло је до оплодње јајне ћелије (Слика 15). При том треба обратити пажњу на време које је протекло од оплодње до процене, јер за неке од метода *IVF* треба мање, а за неке више времена за формирање *PN*, док се *PB* са временом може распасти. Поред броја *PN* битна је и њихова величина, симетрија и позиција, при чему је идеално да су подједнаке величине, смештени близу један другог и постављени централно унутар саме ћелије. Треба обратити пажњу и на број и позицију пронуклеолуса (енг. *nucleolar precursor body* - *NPB*) унутар *PN*-ова, којих би требало бити од 5 до 7 са истим бројем у сваком *PN*-у (55).



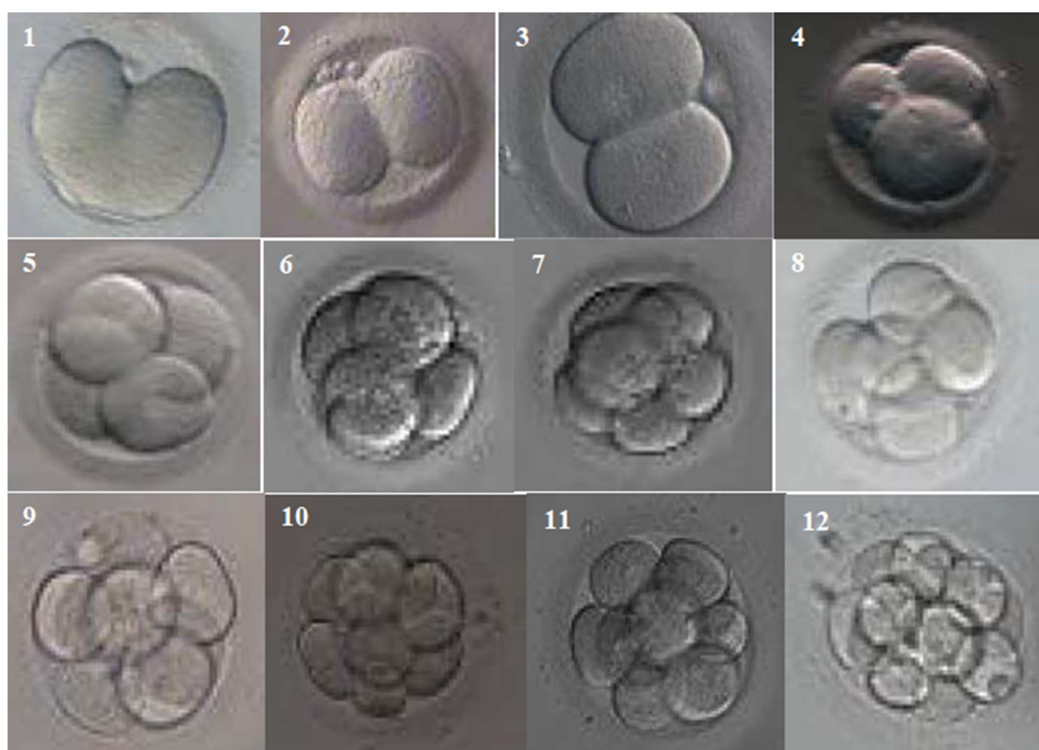
Слика 15. Оплођене јајне ћелије, зиготи дан 1.

1. Нормално оплођена јајна ћелија: два пронуклеуса, два поларна тела 2. Неправилно оплођена јајна ћелија: три пронуклеуса 3. Неправилно оплођена јајна ћелија без пронуклеуса, али са два поларна тела 3. Јајна ћелија која је морфолошки лоша, али способна са оплодњу има два пронуклеуса, бројне вакуоле и неправилан перивителински простор (модификовано из Elder и Dale 2011)

1.6.3. Ембрион (дан 2. и 3.)

Око 24 часа након провере оплодње проверава се деоба насталог зигота. Осим времена деобе, разматра се и њена правилност. Морфолошка процена ембриона укључује оцену броја и облика бластомера (Слика 16) и процента фрагментације (Слика 17) (111).

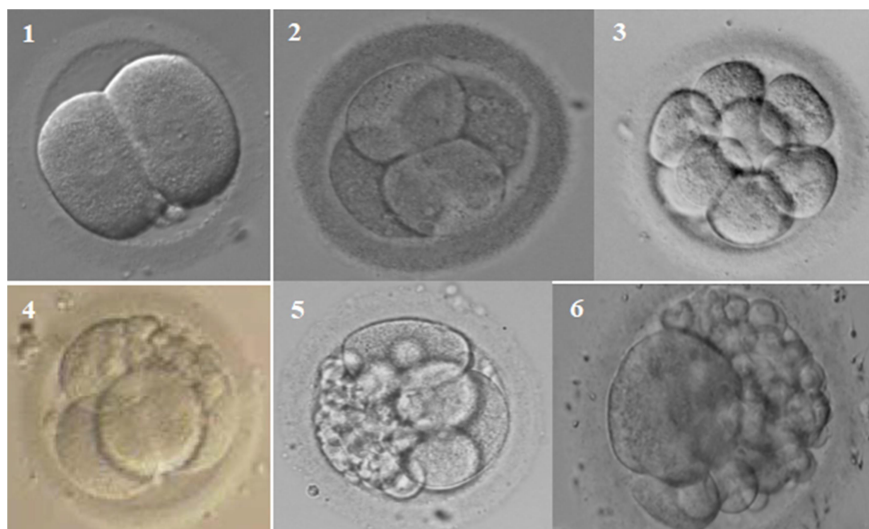
Идеално је да други дан развоја ембрион има четири ћелије, а трећи дан, осам ћелија (Слика 16). Превише спора деоба може указивати на смањен имплантациони потенцијал, док превише брза деоба често резултира настанком абнормалности (111).



Слика 16. Фазе развоја ембриона на дан 2. и 3.

1. Зигот који пролази кроз прву митозу која није завршена до 25 сати након оплодње, види се митотички жљеб, овај ембрион се процењује као једноћелијски ембрион; 2. Прва деоба ембриона је при крају, али две ћерке ћелије још увек нису раздвојене, овај ембрион се процењује као двоћелијски ембрион; 3. Двоћелијски ембрион са бластомерама једнаке величине сваки садржи по једно једро; 4. Ембрион са три ћелије са једном већом бластомером и две мање бластомере; 5. Ембрион са четири бластомере једнаке величине, сваки садржи једно једро; 6. Ембрион са пет бластомера, постоји мала разлика у величини ћелија, али није довољно значајна да би се могла назвати ембрионом неуједначене величине; 7. Ембрион са шест бластомера од којих су четири мање и две веће бластомере; 8. Ембрион од седам бластомера од којих четири имају једно једро; 9. Ембрион од осам бластомера једнаке величине без видљивих једара. 10. Ембрион од девет бластомера дан 3., једна бластомера је нешто већа, а једна бластомера је нешто мања од осталих; 11. Ембрион са десет бластомера са видљивим једрима у неким бластомерима; 12. Ембрион са више од 10 ћелија дан 3. (модификовано из Prados и сар, 2012)

Фрагментација мања од 10% означава се као блага, од 10 до 25% као умерена, док се фрагментација већа од 25% сматра јаком (Слика 17). Изражена фрагментација повезана је са лошијом вијабилношћу ембриона (111).



Слика 17. Поређење ембриона са фрагментацијом и без фрагментације

1. Ембрион са две бластомере без фрагментације; 2. Ембрион са четири бластомере без фрагментације; 3. Ембрион са осам бластомера без фрагментације; 4. Ембрион са четири бластомере исте величине, без видљивих једара и са 10–20% фрагментације; 5. Ембрион са четири бластомере и са 50% фрагментације. 6. Ембрион са четири бластомере и са више од 50% фрагментације (модификовано из Elder и Dale 2011)

Као део морфолошке процене, могу се пратити и друге морфолошке карактеристике као што су: гранулација цитоплазме, изглед мембране и присутност вакуола (Слика 18) (111).



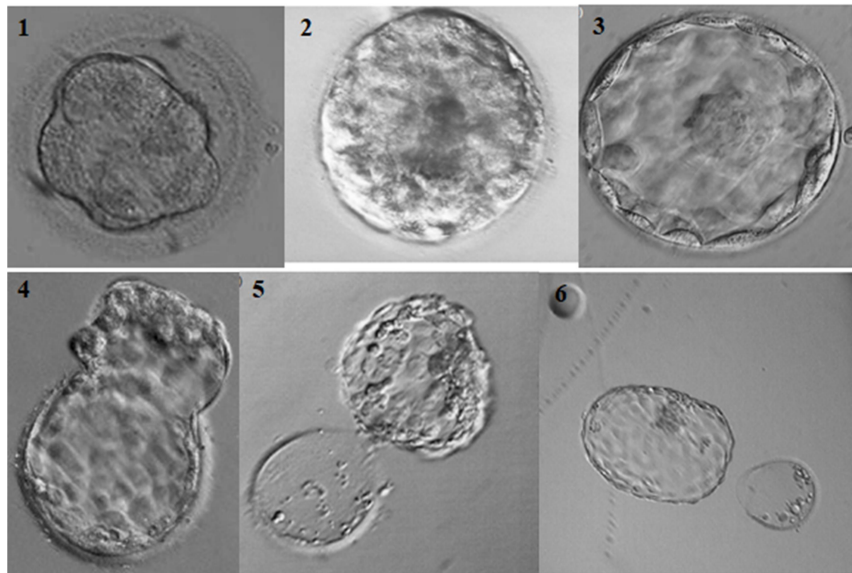
Слика 18. Аномалије цитоплазме ембриона

1. Ембрион од осам бластомера са једном бластомером која има малу вакуолу; 2. Ембрион од осам бластомера са цитоплазмом која садржи грануле (модификовано из Prados и сар, 2012)

Коначно, идеални ембрион на дан 2. има четири ћелије једнаке величине, са по једним једром, и са мање од 10% фрагментације, док идеални ембрион на дан 3. има осам ћелија једнаке величине, са по једним једром и са мање од 10% фрагментације (111)

1.6.4. Бластициста (дан 5.)

Морфолошка процена бластоцисте укључује оцењивање величине бластоцела, унутрашње ћелијске масе (енг. *inner cell mass* - *ICM*) и трофоектодерма (енг. *trophectoderm* - *TE*). Идеална бластоциста треба да има истакнут, лако уочљив *ICM*, састављен од великог броја ћелија које су чврсто стиснуте једна уз другу. *TE* би требало да се састоји од великог броја ћелија које чине кохезивни епител (Слика 19) (112).



Слика 19. Бластициста - фазе развоја и морфологија

1. Сабијање моруле; 2. Ране фазе кавитације 3. Потпуно проширена бластоциста врхунског квалитета са добро развијеним *ICM*-ом и трофоектодермом, проређена зона, покренут процес *hatching-a*; 4. Врхунска бластоциста у процесу *hatching-a*; 5. *Hatching* бластоцисте пред напуштањем зоне; 6. Потпуни *hatching* бластоцисте и празна зона (модификовано из Elder и Dale 2011)

II ЦИЉ СТУДИЈЕ

Основни циљ овог истраживања је био да се процени утицај састава фоликуларне течности на квалитет јајних ћелија, а самим тим и на исход вантелесне оплодње. На основу основног циља, издвојени су следећи истраживачки задаци:

1. Утврдити године старости, вредност *BMI* и концентрацију серумског *AMH* у испитиваној популацији и утврдити да ли се вредности ових параметра разликују у односу на исход процеса вантелесне оплодње
2. Утврдити карактеристике оваријалног одговора у испитиваној популацији и да ли се оваријални одговор разликују по старосним категоријама и између група у односу на исход процеса вантелесне оплодње
3. Утврдити квалитет јајних ћелија и успех фертилизације у испитиваној популацији и да ли постоје разлике у различитим старосним категоријама и између група у односу на исход процеса вантелесне оплодње
4. Утврдити да ли метода оплодње утиче на исход вантелесне оплодње испитиване популације
5. Утврдити квалитет ембриона у испитиваној популацији и утврдити да ли постоје разлике у различитим старосним категоријама и између група у односу на исход процеса вантелесне оплодње
6. Утврдити да ли се дан ембриотрансфера разликује у различитим старосним категоријама и да ли исход процеса вантелесне оплодње зависи од дана ембриотрансфера
7. Утврдити да ли постоји разлика између исхода процеса вантелесне оплодње у различитим старосним категоријама у испитиваној популацији
8. Утврдити концентрације одабраних параметара у фоликуларној течности испитиване популације и утврдити да ли се разликују у различитим старосним категоријама и у односу на исход процеса вантелесне оплодње
9. Утврдити да ли постоји разлика у концентрацији одабраних параметара у узорцима фоликуларне течности у односу на године и у односу на исход процеса вантелесне оплодње у испитиваној популацији
10. Утврдити корелацију вредности одабраних параметара у фоликуларној течности са вредностима *BMI* и *AMH* у серуму, карактеристикама оваријалног одговора, квалитетом јајних ћелија, успехом фертилизације и исходом процеса вантелесне оплодње испитиване популације
11. Утврдити да ли неки од одабраних параметара анализираних у фоликуларној течности могу служити као предиктивни маркер исхода процеса вантелесне оплодње

III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Експериментални део истраживања реализован је на Одељењу за биомедицински потпомогнуту оплодњу, Клинике за гинекологију и акушерство, Клиничког центра Крагујевац и у Служби за лабораторијску дијагностику, Клиничког центра Крагујевац. Истраживање је одобрено од стране Етичког комитета Клиничког центра Крагујевац (решење број 01-20-582 / 25.06.2020.). Ово је експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*.

3.1. Испитивана популација

Истраживањем је обухваћено 120 пацијенткиња, које су биле укључене у Национални програм *БМПО* финансиран од стране Министарства здравља Републике Србије, а које су се на комисији одлучиле да поступак *БМПО* раде на Одељењу за *БМПО*, Клиника за гинекологију и акушерство, Клинички центар Крагујевац. Свих 120 учесница у истраживању, пре укључивања у само истраживање, информисано је о циљевима истраживања и све су потписале пристанак за учешће у истраживању.

По критеријумима Републичког фонда за здравствено осигурање и по протоколима Одељења сви пацијенти су пре уласка у сам процес морали одрадити следеће анализе и дијагностику:

- микробиолошка испитивања (вагинални и цервикални брис на бактерије и гљивице, цервикални брис на *Chlamydia trachomatis*, вагинални брис на бактеријску вагинозу, *Toxoplasma gondii*, *VDRL* (енг. *Venereal disease research laboratory test*),
- вирусолошка испитивања (хепатитис Б (енг. *Hepatitis B surface antigen- HbsAg*), хепатитис Ц (енг. *Hepatitis C virus- HCV*), вирус хумане имунодефицијенције (енг. *Human immunodeficiency virus- HIV*), Rubella),
- хормонски статус (2-3 дана менструалног циклуса - *FSH*, *LH*, естрадиол, прогестерон, тестостерон, пролактин, *TSH*, *T3*, *T4*, *AMH*),
- скрининг грлића (брис по Рараниколац, колпоскопија),
- ултразвучни преглед обављен вагиналном сондом,
- испитивање проходности јајовода хистеросалпингографијом.

Критеријуми за укључивање у истраживање: супружници, односно ванбрачни партнери код којих су исцрпљене друге могућности лечења неплодности, супружници односно ванбрачни партнери који у постојећој заједници имају једно дете добијено у поступку *БМПО*, жена до навршене 43. године живота, очувана функција јајника, нормалан индекс телесне масе жене (*BMI* мањи од 30), спермограм партнера у границама нормале (уколико је потврђен проблем код женског партнера, нпр. непроходни јајоводи) или са дијагностикованим смањеним бројем сперматозоида, смањеном покретљивошћу сперматозоида или смањеним проценатом морфолишки нормалних сперматозоида (уколико није/јесте потврђен проблем код женског партнера).

Критеријуми за искључење из истраживања: Парови код којих нису исцрпљене друге могућности за лечење инфертилитета, жене код којих није очувана резерва јајника, жене које имају *BMI* >30 kg/m², аномалије и бенигни тумори материце, јајовода и јајника који онемогућавају процес *ВТО*, настанак и развој трудноће, постојање малигнух или тумора сумњивих на малигнитет на материци, јајоводу и

јајнику, било која обољења (интернистичка, имунолошка, инфектолошка, неуролошка, психијатријска) уколико су без дозволе за спровођење процедуре *БМПО* одговарајућег специјалисте, обољења код којих би анестезија или трудноћа потенцијално угрожавали живот пацијенткиње. Из студије су искључене оне пацијенткиње које болују од било које друге ендокрине болести за коју је потврђено да утиче на фертилитет и пацијенткиње код чијих је партнера потврђена дијагноза азооспермије.

Укључивање пацијената у истраживање је обављено на Одељењу за *БМПО*. Свим особама које су упућени за процес вантелесне оплодње на Одељењу за *БМПО*, а које задовољавају укључујуће и немају искључујуће критеријуме понуђено је учешће у студији. Испитаници су укључени у студију само ако на то пристану добровољно, након потписивања формулара Информисаног пристанка уз пуну обавештеност. Након потписивања пристанка за учешће у студији, прикупљени су анамнестички подаци.

Испитиване пацијенткиње су биле подељене у две групе у односу на исход вантелесне оплодње: прву групу су чиниле пацијенткиње код којих није потврђена трудноћа, док су другу групу чиниле пацијенткиње којима је потврђена трудноћа. Такође су биле подељене у две групе у односу на године старости: прва група оне које имају 35 година и млађе од 35 година, док је друга група обухватала старије од 35 година.

3.2. Материјал

У току поступка стимулације од лекова су коришћени уринарни гонадотропини (**Menopur** 75i.j., Menotrofin – хумани менопаузални гонадотропин, Ferring Pharmaceuticals, Немачка или **Merional** 75 i.j., Menotrofin - хумани менопаузални гонадотропин, IBSA Institut Biochimique S.A., Швајцарска) или рекомбинантни гонадотропини (**Gonal-F** 75i.j., Folitropin alfa, Merck Serono, Modugno, Италија) и GnRH антагонисти (**Cetrotide** 0.25 mg/ml, Cetroreliks acetat, Merck Healthcare KGaA, Немачка). Завршна матурација јајних ћелија је изазвана или са 5000 i.j. хорионским гонадотропином (**Pregnyl**, , N.V. Organon, Холандија) или са 250 mcg хорионским гонадотропином алфа (**Ovitrelle**, Merck Serono S.p.A., Италија). За подршку лутеалне фазе коришћено је 125 mg **прогестерона депо** (hidroksiprogesteron kaproata, Galenika, Србија).

Аспирација јајних ћелија је рађена под контролом **ултразвука** и уз помоћ **аспирационе игле дуплог лумена** (Cook® EchoTip® Double Lumen Aspiration Needle, Australia) повезане на **аспирациону пумпу** (K-MAR-5200, Cook® Vacuum Pump, Australia)

Као биолошки материјал за анализу коришћена је **фоликуларна течност** и **јајне ћелије**. За лабораторијску анализу је издвајана фоликуларна течност у којој су нађене јајне ћелије. Целокупна количина фоликуларне течности центрифугирана је на 3000 обртаја 10 минута како би се издвојила чиста фоликуларна течност, без ћелијских елемената. За саму анализу је узето 5 ml од укупне количине фоликуларне течности.

Медијуми коришћени за култивацију јајних ћелија и ембриона су **Gamete Buffer, Fertilization Medium, Cleavage Medium** и **Blastocyst Medium** (Cook® Medical Inc., Australia). Од медијума су коришћени још и ензим хијалуронидаза (**Hyasa**, Fertil Pro, Немачка), **Ovoil, PVP** и **Follicule Flush Buffer** (Cook® Medical Inc., Australia). За ембриотрансфер је коришћен медијум **Embryogluе** (Vitrolife, Göteborg, Sweden).

Follicle Flush Buffer (Cook® Medical Inc., Australia) је медијум искључиво намењен за испирање фоликула током колекције (прикупљања) јајних ћелија HEPES пуферован, са антибиотиком који није пеницилински.

Gamete Buffer (Cook® Medical Inc., Australia) је медијум за одржавање јајне ћелије у поступку уношења сперматозоида у ооплазму, HEPES пуферован, са присуством неесенцијаних аминокиселина које су неопходне за очување квалитета јајне ћелије у поступку микрофертилизације, са антибиотиком који није пеницилински и са хуманим серумским албумином фармацеутског степена чистоће (тестиран на *HbsAg*, *HCV*, *HIV* и сифилис).

Fertilization Medium (Cook® Medical Inc., Australia) је медијум за фертилизацију јајне ћелије и развој до пронуклеусног стадијума – зигота, односно за културу првих 20 сати садржи бикарбонатни пуфер, хумани серумски албумин фармацеутског степена чистоће (тестиран на *HbsAg*, *HCV*, *HIV* и сифилис), са антибиотиком који није пеницилински.

Cleavage Medium (Cook® Medical Inc., Australia) је медијум за култивацију ембриона (од зигота до стадијума од осам бластомера) и трансфер у материцу - бикарбонатни пуфер, без HEPES-а, хумани серумски албумин фармацеутског степена чистоће (тестиран на *HbsAg*, *HCV*, *HIV* и сифилис) и са антибиотиком који није пеницилински.

Blastocyst Medium (Cook® Medical Inc., Australia) је медијум за развој бластоцисте и трансфер ембриона у материцу - бикарбонатни пуфер, хумани серумски албумин фармацеутског степена чистоће (тестиран на *HbsAg*, *HCV*, *HIV* и сифилис), са антибиотиком који није пеницилински.

Huasa - ензим хијалуронидаза (Huasa, Fertil Pro, Немачка) је медијум за денудацију јајне ћелије, фармацеутског степена чистоће (тестиран на *HbsAg*, *HCV*, *HIV* и сифилис).

Ovoil (Cook® Medical Inc., Australia) је уље за култивацију ембриона у процесу *IVF*, течни парафин за прекривање медијума за културу, стерилно и пречишћено 100% парафинско уље.

PVP (Cook® Medical Inc., Australia) је медијум за успоравање покретљивости сперматозоида - бикарбонатни пуфер, хумани серумски албумин фармацеутског степена чистоће (тестиран на *HbsAg*, *HCV*, *HIV* и сифилис); са антибиотиком који није пеницилински.

Embryogluе (Vitrolife, Göteborg, Sweden) је бикарбонатно пуферисан медијум за ембриотрансфер који садржи хијалурон и рекомбиновани хумани албумин.

Инкубатори примењени за еквилибрацију медијума и за култивацију јајних ћелија и ембриона су инкубатори K-MINK 1000 (William a COOK Australia Pty Ltd). Пластика која је коришћена за прикупљање јајних ћелија, као и за култивацију ембриона је *IVF* тестирана и одобрена од стране произвођача Vitrolife, Göteborg, Sweden. Трансфер ембриона је рађен у медијуму Embryogluе (Vitrolife, Göteborg, Sweden) са ембриотрансфер катетером Frydman ultrasoft eho.

Култивација од гамета до бластоцисте се одвија у у K-MINC инкубатору на температури од 37°C, у атмосфери 6% CO₂, 21% O₂ и остатак N₂ и при влажности 95%.

Сав потрошни материјал од пластике, као и сви медијуми су стерилни и *IVF* тестирани и одобрени. Сви медијуми се допремају у оригиналном паковању и користе се као готови медијуми.

3.3. Методе

Фоликуларна течност је добијена **пункцијом фоликула** већих од 18mm након **контролисане оваријалне стимулације** у сали за интервенције на Одељењу *БМПО*. Преглед добијене фоликуларне течности и сакупљање јајних ћелија под стереомикроскопом обављен је у ембриолошкој лабораторији на Одељењу *БМПО* под контролисаним условима. **Ембриолошки поступци** током *IVF* процеса обављају више корака: колекција јајних ћелија, конвенционални *IVF*, *ICSI*, провера фертилизације, оцена ембриона и ембриотрансфер. **Биохемијски параметри** фоликуларне течности анализирани су у Служби за лабораторијску дијагностику, Клиничког центра Крагујевац и у Институту за јавно здравље Крагујевац.

3.3.1. Стимулација овулације

Свим пацијенткињама је другог или трећег дана менструалног циклуса пре укључивања у поступак *IVF* одређиван базални хормонски статус. Одређиван је серумски ниво естрадиола, прогестерона, *FSH* и *LH*.

Примењиван је кратки протокол стимулације. Одговор на стимулацију јајника је праћен ултразвучним прегледима и на основу резултата хормонског статуса. На основу ових резултата свакодневно је одређивана доза лекова за стимулацију.

Стимулација овулације је започињана другог дана менструалног циклуса уринарним гонадотропинима (*Merionalom* или *Menopurom*) и/или рекомбинантним гонадотропинима (*Gonalom-F*). Почетна доза гонадотропина зависила је од процене гинеколога на основу хормонског статуса жене, година старости, резерве јајника, ултразвучног налаза и евентуално одговора жене на претходне стимулације. Од петог дана стимулације свакодневно су мерене су вредности нивоа серумског естрадиола и праћен је ултразвучни преглед вагиналном сондом, па све до стоп инјекције. Са порастом естрадиола и уз присуство фоликула $\geq 14\text{mm}$ укључиван је *GnRH* антагониста (*Cetrotide*).

Стимулација је трајала док водећи фоликул није достигао дијаметар од 20 mm или два или више фоликула дијаметра 18mm. Када је пораст концентрације естрадиола у серуму одговарао присуству два или више фоликула $>18\text{ mm}$, примењиван је хориогонадотропин (*Pregnyl*) или хориогонадотропин алфа (*Ovitrelle*), а затим је 34-36 сати након тога одређиван термин аспирације јајних ћелија.

3.3.2. Аспирација јајних ћелија

Аспирација јајних ћелија је хируршка интервенција, спровођена је под контролом ултразвука док је пацијент у општој анестезији. Интервенција је трајала око 20 до 30 минута у зависности од броја и доступности фоликула у јајницима. Након завршене аспирације фоликула, добијена фоликуларна течност је прегледана под микроскопом у ембриолошкој лабораторији и утврђивано је колико има јајних ћелија и каквог су квалитета на основу изгледа комплекса кумулус-јајна ћелија.

3.3.3. Ембриолошки поступци током процеса *IVF*

Корак 1.: Колекција јајних ћелија (дан 0.)

Сат времена пре почетка аспирације укључене су ламинарне коморе да се грејне плоче загреју на 37°C, инвертни микроскоп, као и грејна плоча инвертног микроскопа. Све радне површине и грејне плоче су дезинфиковане средством које је за то предвиђено и *IVF* тестирано.

Пола сата пре почетка аспирације припремају се петри кутије за преглед аспириата, шприц од 1 ml, капиларна пипета и стављају на грејну плочу у ламинарној комори да се загреју.

Пре почетка аспирације биолог додаје медицинској сестри термоблок угрејан на 37°C, неколико празних епрувета у зависности од броја фоликула и епрувету са медијумом за испирање фоликула (Follicle Flush Buffer) који се у овом случају користи за проверу проходности аспирационе игле. Током аспирације, додају се шприцеви са медијумом за испирање фоликула уколико је то потребно. Биолог монтира капиларну пипету на шприц, унутар коморе, којом током аспирације прикупља јајне ћелије.

Медицинска сестра додаје термоблок са епруветом у којој се налази аспириат. Биолог узима епрувету и аспириат пребацује у петри кутију и прегледа под микроскопом. Из инкубатора узима center well са медијумом за испирање јајне ћелије (Gamete Buffer) и ставља на грејну плочу у ламинарној комори. Јајне ћелије се испирају у медијуму од остатка фоликуларне течности. Након завршетка аспирације, у center well са медијумом за фертилизацију (Fertilization Medium) се помоћу капиларне пипете пребацују јајне ћелије из center well-а са медијумом за испирање јајне ћелије у center well са медијумом за фертилизацију. Јајне ћелије се броје, процењује се њихов стадијум зрелости на основу *stimulus-corona-oocita* комплекса и распоређују у еквилибрисан медијум за фертилизацију, те одлажу у инкубатор где остају до момента оплодње.

Оцена квалитета јајне ћелије на основу *stimulus-corona-oocita* комплекса

Јајна ћелија пролази кроз 5 стадијума зрелости:

- незрела (тесно збијене ћелије кумулуса и короне уз јајну ћелију, ооплазма се не види јасно),
- скоро зрела (експандиран кумулус, компактна корона се налази уз јајну ћелију, али није тесно збијена),

- зрела (експандиран кумулус, радијална корона, видљива зона пеллуцида и бистра ооплазма),
- постматурна (експандиран кумулус са тамним грудвицама, радијална корона ирегуларна и некомплетна, гранулисана и тамна ооплазма) и
- атретична (често без кумулуса, корона са грудвицама и ирегуларна уколико је присутна, тамна ооплазма неправилног облика).

Процена зрелости јајне ћелије на основу нуклеарне зрелости

- герминативна везикула (присуство везикуле у ооплазми и одсуство поларног тела). Оваква ооцита је диплоидна.
- јајна ћелија у метафази I или MI јајна ћелија (одсуство везикуле у ооплазми и одсуство првог поларног тела). Оваква ооцита је такође диплоидна.
- јајна ћелија у метафази II или MII јајна ћелија (одсуство везикуле у ооплазми, присуство првог поларног тела). Оваква ооцита је хаплоидна и једина која се може подвргнути процесима оплодње.

Јајне ћелије на стадијуму герминативне везикуле или MI стадијуму нису погодне за рад и мора се сачекати њихово дозревање. Процена зрелости јајне ћелије се може установити и на основу цитоплазматске зрелости. Присуство тамних накупина у ооплазми је знак цитоплазматске незрелости, чак и ако је ооцита у MII фази.

Корак 2.: IVF (дан 0.)

Након два сата од аспирације, биолог у ламинарној комори припрема све што је потребно од материјала за извођење IVF-а: монтира капиларну пипету на шприц од 1 ml, монтира одговарајући наставак на аутоматску пипету, вади из инкубатора 4-well са медијумом за фертилизацију (Fertilization Medium) и обележава га (име и презиме пацијента, број комисије и датум), на крају доноси center well са јајним ћелијама. Биолог капиларном пипетом прво узима мало медијума, па затим јајне ћелије (максимално 3) и пребацује их у први бунарић 4-well-а. Аутоматском пипетом са наставком од 0.5-10 μ l око јајних ћелија додаје обрађен узорак ејакулата. Процес понавља за сваки бунарић 4-well-а у зависности од броја јајних ћелија. Након тога, врши проверу кретања и присуства сперматозоида под стереомикроскопом и враћа 4-well у K-MINC инкубатор. Након 18-20 сати од фертилизације, врши се провера/успешност фертилизације.

Корак 3.: ICSI (дан 0.)

Припрема микроманипулатора: Пре почетка извођења ICSI методе потребно је правилно припремити микроманипулатор који се користи за извођење ове методе. Део микроманипулатора који служи за држање јајне ћелије (холдинг) ради помоћу ваздуха, а део који служи за манипулацију сперматозоида (микроинјектор) ради помоћу парафинског уља, тако да је прво потребно напунити микроинјектор парафинским уљем. Након тога, потребно је намонтирати микропипету за манипулацију сперматозоидима, као и микропипету за придржавање јајне ћелије. Потребно је пажљиво убацили микропипете у отвор држача. Како би се манипулација правилно и несметано одвијала, неопходно је да обе микропипете буду постављене у одговарајући

положај у односу на подлогу. То значи да врх и једне и друге микропипете мора бити постављен паралелно у односу на подлогу, тако да закривљени део са дном подлоге прави одговарајући угао од 30°.

Поступак извођења ICSI методе: Биолог монтира наставке различитог промера на денудационе пипете, припрема шприц од 1 ml и капиларну пипету, вади из инкубатора 4-well са медијумом за денудацију (медијум Hyasa) и center well са јајним ћелијама и ставља их у ламинарну комору. Пребацује неколико јајних ћелија у први бунарић 4-well-а у коме се налази медијум за денудацију, остави да стоје до 30 секунди и неколико пута их пропере (аспирира јајну ћелију и враћа назад у медијум) да би се кумулус што више уклонио, а потом их пребацује денудационом пипетом са наставком у наредне бунариће у којима се налази медијум за испирање јајне ћелије (Gamete Buffer). Ћелије се испирају све док се кумулус у потпуности не уклони. Након денудације извадити из инкубатора ICSI dish са медијумом за успоравање сперматозоида (PVP медијум) и испирање јајне ћелије (Gamete buffer). Одмах након денудације, денудационом пипетом са наставком пребацити јајне ћелије у ICSI dish у микро капи медијума за испирање/одржавање јајне ћелије, а сперматозоиде додати аутоматском пипетом са наставком од 0.5-10 μ l у медијум за успоравање сперматозоида. На грејну плочу (37°C) инвертног микроскопа ставити ICSI dish и објективом најмањег увећања пронаћи видно поље, изоштрили нит у којој се налазе сперматозоиди и довести микроинјекциону иглу у исту раван. Микроинјекционом иглом извршити имобилизацију одабраног сперматозоида и аспирирати га тако да при инјектирању предњачи глава сперматозоида. Пребацити видно поље на кап медијума за испирање/одржавање у којој се налази јајна ћелија и довести holding пипету у исту раван. Holding пипетом привући јајну ћелију и фиксирати је тако да поларно тело буде на 12 или 6 сати. Микроинјекциону иглу довести у раван са holding иглом и извршити инјектирање сперматозоида у јајну ћелију. Отпустити јајну ћелију са holding игле. Цео процес ICSI методе треба обавити брзо због могућности промене pH вредности медијума, као и због промене температуре.

Након интрацитоплазматског микроинјектирања сперматозоида пребацити јајне ћелије денудационом пипетом са наставком у 12-well у ком се налази медијум (Cleavage Medium) за рани ембрионални развој од 1.-3. дана. 12 well обележити (име и презиме и датум) и оставити у K-MINC инкубатор. Након 14-18 сати од интрацитоплазматског микроинјектирања сперматозоида, извршити проверу/успешност фертилизације.

Корак 4. : Провера фертилизације (Дан 1.)

Ћелије које су подвргнуте IVF методи прво очистити денудационим пипетама са наставцима различитог промера, као приликом припреме ћелија за ICSI методу, од кумулусне масе и заосталих сперматозоида. Након чишћења пребацити их денудационом пипетом у 12-well, у медијум за рани ембрионални развој (Cleavage Medium) од 1.-3. дана и посматрати под инвертним микроскопом и ћелије из IVF-а и ICSI-а и проверити фертилизацију.

Сигурни знаци успешне фертилизације су: присуство 2 пронуклеуса и присуство 2 поларна тела. Пронуклеуси би требало да буду приближно исте величине (уколико постоји велика разлика у величинама највероватније је реч о хромозомској аберацији). Поларна тела треба да се налазе паралелна са лонгитудиналном осом која пролази кроз пронуклеусе, без размака између 2 поларна тела, овалног облика, без фрагментација.

Оплођена јајна ћелија треба бити овалног облика са интактном зоном пелуцидом, без вакуола и гранулација у ооплазми. Било које одступање од наведених правила може указивати на развој ембриона лошег квалитета или чак присуство хромозомских аномалија. Само оплођене јајне ћелије које имају 2 прокунлеуса и 2 поларна тела сматрају се правилно оплођеном јајном ћелијом и једино такви зиготи се узимају у обзир за ембриотрансфер. Неправилно оплођење које подразумева присуство више од 2 пронуклеуса (полиплоидија) или присуство 1 пронуклеуса изискује одбацивање из даље култивације.

Сви правилни зиготи који су добијени *IVF* и *ICSI* методом смештају се у нову кап 12-well-а са медијумом за рани ембрионални развој од 1. до 3. дана и одлажу у К-MINC на даљу култивацију.

Корак 5.: Оцена ембриона (Дан 2.)

Ембрионе из 12-well-а посматрати под инвертним микроскопом и оценити их. Процену ембриона извршити према критеријумима из Табеле 1.

Табела 1. Критеријуми за оцењивање ембриона дан 2 и 3

Фрагментација	Бластомере
1- до 10% волумена ембриона	А- једнаке бластомере
2- 10- 50% волумена ембриона	Б- неједнаке бластомере
3- више од 50% волумена ембриона	Ц- присуство вакуола и мултинуклеација

Оцена морфологије ембриона врши се тако што се ембриону додељује ознака од 3 симбола (два броја и једно слово), на основу његових морфолошких карактеристика. Први симбол (број) означава број бластомера, други симбол (слово) означава оцену самих бластомера, док трећи симбол (други број) означава оцену фрагментације. На тај начин ембрион који је, на пример, означен/оцењен као 8А1 је следећег квалитета: има 8 бластомера које су једнаке, док фрагментација није већа од 10% волумена ембриона.

Пребацити ембрионе денудационом пипетом са наставком у нову кап медијума за рани ембрионални развој од 1. до 3. дана. Вратити у К-MINC на даљу култивацију.

Корак 6.: Оцена ембриона (Дан 3. или дан 5.)**Дан 3.**

Ембрионе из 12-well-а посматрати под инвертним микроскопом, пре ембриотрансфера, извршити процену квалитета ембриона и одабрати ембрионе за ембриотрансфер. Процену ембриона извршити према критеријумима из Табеле 1.

У случају трансфера бластоцисте, наставља се са култивација ембриона до дана 5. У том случају ембриони се пребацују денудационом пипетом са наставком у медијум за развој ембриона од дана 3. до дана 5. - медијум за развој бластоцисте (Blastocist Medium).

Дан 5.

Бластоцисте из 12-well-а посматрати под инвертним микроскопом, пре ембриотрансфера, извршити процену квалитета бластоцисти и одабрати бластоцисте за ембриотрансфер. Процену квалитета бластоциста извршити према критеријумима из Табеле 2.

Табела 2. Критеријуми за оцену ембриона дан 5

Стадијум развоја	Inner Cell Mass (ICM)	Трофоектодерм
РБ - рана бластоциста	А - велики број тесно скупљених ћелија	А - много ћелија формира кохезивни епител
БЛ - бластоциста	Б - велики број ћелија које нису тесно груписане	Б - мањи број ћелија који гради лабав епител
ЕБ - експандирана бластоциста	Ц - веома мало ћелија	Ц - веома мали број ћелија
ХБ - хечинг бластоцисте		

Оцена морфологије бластоцисте одређује се на начин који је сличан оцењивању морфологије ембриона. Ознака/оцена коју бластоциста добија састоји се из четири симбола (четири слова). Прва два слова означавају стадијум развоја бластоцисте, треће слово означава оцену ICM (унутрашње ћелијске масе), док последње слово означава оцену трофоектодерма. Па тако, бластоциста која је добила ознаку/оцену РБ БА, јесте рана бластоциста, са великим бројем ћелија које нису тесно груписане (када је у питању унутрашња ћелијска маса) и са много ћелија које формирају кохезивни епител (када је трофоектодерм у питању).

Корак 7: Ембриотрансфер (дан 3. или дан 5.)

Пребацити одабране ембрионе за ембриотрансфер денудацином пипетом са наставком у center well са медијумом за ембриотрансфер (Embriogluе) и оставити најмање 20, највише 60 минута да стоје пре ембриотрансфера у инкубатору.

Катетер за ембриотрансфер извадити да се греје у ламинарној комори. Катетер за ембриотрансфер се састоји из спољашњег и унутрашњег дела. Спољашњи део катетера додати лекарима, на унутрашњи намонтирати шприц. Спољашњи део изграђен је од савитљиве пластике, градуисан је и овај део катетера гинеколог пласира кроз грлић пацијенткиње у материцу према претходно утврђеној путањи и позицији (под ултразвучном контролом). На једну страну унутрашњег дела катетера која је за то предвиђена, поставити шприц са медијумом за ембриотрансфер и испунити катетер медијумом за ембриотрансфер целом његовом дужином.

Када је установљена одговарајућа позиција спољашњег (водећег) дела катетера, биолог помоћу другог краја унутрашњег дела катетера, који се завршава силиконским делом, увлачи ембрион/ембрионе из center well-а (који је до тог момента стајао у инкубатору) у катетер помоћу вакуума који прави шприцем на другом крају катетера. Све се обавља под стерео микроскопом. Одмах по увлачењу ембриона у катетер, биолог предаје катетер гинекологу који пласира унутрашњи део катетера у материцу пацијенткиње кроз претходно позиционирани спољашњи део катетера. Након 30 секунди, биолог притиском на шприц пласира ~20 μ l садржаја из катетера што је довољно да се ембриони нађу у материци пацијенткиње.

Одмах по депласирању катетера из материце пацијенткиње, биолог проверава да ли су сви ембриони истиснути из катетера. Уколико је ембрион заостао у катетеру неопходно је испрати га у медијуму за ембриотрансфер и поновити целу процедуру.

Трудноћа је потврђивана позитивним налазом серумског нивоа хормона β -hCG 14 дана после ембриотрансфера, док су клиничке трудноће потврђиване трансвагиналним ултразвучним налазом гестаацијског мешка са виталним ембрионом 6-те гестаацијске недеље.

3.3.4. Варијабле које се мере у студији

Варијабле истраживања су груписане у пет категорија:

1. Концентрација хормона (естрадиол, прогестерон, тестостерон и *FSH*) у фоликуларној течности
2. Ниво *IL-6* у фоликуларној течности
3. Ниво биоелемената (Na, K, Ca, Mg и Fe) у фоликуларној течности и
4. Ниво ензима (*LDH*, *AST*, *ALT* и *ALP*).

Вредности естрадиола, прогестерона, тестостерона и *FSH* у фоликуларној течности су одређиване су хемилуминесцентним имуноесејом на апарату UniCel 600, Becton Coulter.

Вредности интерлеукина-6 у фоликуларној течности су анализиране хемилуминесцентним имуноесејом на апарату UniCel 600, Becton Coulter.

Вредности Na (метода селективне електроде), K (метода селективне електроде, Са (метода аренажо), Mg (метода спектрофотометрија) и Fe (метода колориметрија) у фоликуларној течности одређиване су на апарату AU 680, Весман Coulter.

Вредности ензима *LDH* (метода кинетички UV тест), *AST* (метода кинетички UV тест), *ALT* (метода кинетички UV тест) и *ALP* (метода колориметријски кинетички тест) у фоликуларној течности одређиване су на апарату AU 680, Весман Coulter.

3.3.5. Статистичка обрада и презентација резултата

Пре статистичке обраде података потврђена је правилност расподеле добијених вредности помоћу *Kolmogorov-Smirnov* теста. На основу добијене вредности *p* *Kolmogorov-Smirnov* теста одређиван је тест који је коришћен за статистичку анализу (параметарски тест ANOVA за $p > 0,05$ узорци који имају нормалну расподелу или непараметарски *Mann-Whitney*-ев, *Kruskal-Wallis* и *Hi kvadrat test* тест ако је $p < 0,05$ узорци који немају нормалну расподелу). Коефицијент спирманова корелације ранга је коришћен како би се одредио смер и јачина везе између две променљиве. Коефицијент (*rho*) има вредност од -1 до +1. Предзнак показује да ли је корелација позитивна (обе променљиве заједно и опадају и расту) или негативна (једна променљива опада када друга расте и обрнуто). Вредност тог коефицијента показује јачину везе (0,10 ÷ 0,29 - мала; 0,30 ÷ 0,49 - средња; 0,50 ÷ 1,00 - велика). Предиктивна ефикасност испитиваног параметра анализирана је помоћу ROC анализе. Вредност добијених података је сматран статистички значајним уколико је $p < 0,05$. За статистичку обраду података коришћен је програмски пакет SPSS 20. Све вредности су изражене као средња вредност и приказане су табеларно и графички.

IV РЕЗУЛТАТИ

У оквиру експерименталног рада докторске дисертације испитиван је утицај састава фоликуларне течности на исход процеса вантелесне оплодње. У резултатима су приказани и основни параметри који се прате приликом самог процеса вантелесне оплодње, као и дистрибуција тих параметара у односу на старост пацијенткиња и на исход процеса вантелесне оплодње. Пацијенткиње су на основу година старости подељене у две групе. Групи А припадају пацијенткиње које имају 35 година и мање, док групи Б припадају пацијенткиње које имају више од 35 година. На основу исхода процеса вантелесне оплодње пацијенткиње су подељене такође на две групе. Групи А припадају пацијенткиње са негативним исходом, док групи Б припадају оне са позитивним исходом процеса вантелесне оплодње. Основни параметри који се прате током процеса вантелесне оплодње нам дају ширу слику о самом току процеса вантелесне оплодње. Указују нам које лекове треба применити и у којој дози, говоре нам о томе да ли је примењена терапија за стимулацију јајника на адекватан начин довела до одговора јајника који је очекиван. У овом истраживању је укључено 120 пацијенткиња.

4.1. Подаци о пацијенткињама које су учествовале у студији

У овом делу представљени су резултати основних параметара који се прате током процеса вантелесне оплодње. Прво су приказани резултати основних параметара који су анализирани у односу на укупан број пацијенткиња који је учествовао у студији, а затим њихова дистрибуција у односу на старост пацијенткиња и на исход процеса вантелесне оплодње.

4.1.1. Године старости, *BMI* и *AMH* у серуму

Просечна старост пацијенткиња, средње вредности *BMI* и серумског *AMH* је дата у Табели 3.

Просечна старост пацијенткиња које су учествовале у студији је у складу са прописима које прописује наша држава, а тичу се година живота пацијенткиња које раде процес вантелесне оплодње о трошку Фонда за здравствено осигурање (горња старосна граница је 43 године). Средња вредност *BMI* је у границама референтних вредности које се крећу између 20 и 25 kg/m². Средња вредност серумског *AMH* је ближа је доњој граници нормалних вредности. Године живота утичу на вредности серумског *AMH* па су за жене између 30 и 34 година нормалне вредност *AMH* од 0,71 ng/ml до 7,59 ng/ml, док су за жене старости између 35 и 39 година нормалне вредност *AMH* од 0,405 ng/ml до 6,96 ng/ml.

Табела 3. Године, *BMI* и серумски *AMH* у односу на укупан број пацијенткиња

	Mean	Median	Min	Max	SD
Године	36,74	37,00	25	46	4,74
<i>BMI</i> (kg/m ²)	24,89	25,00	19,70	32,50	2,67
серумски <i>AMH</i> (ng/ml)	2,56	1,81	0,10	17,16	2,89

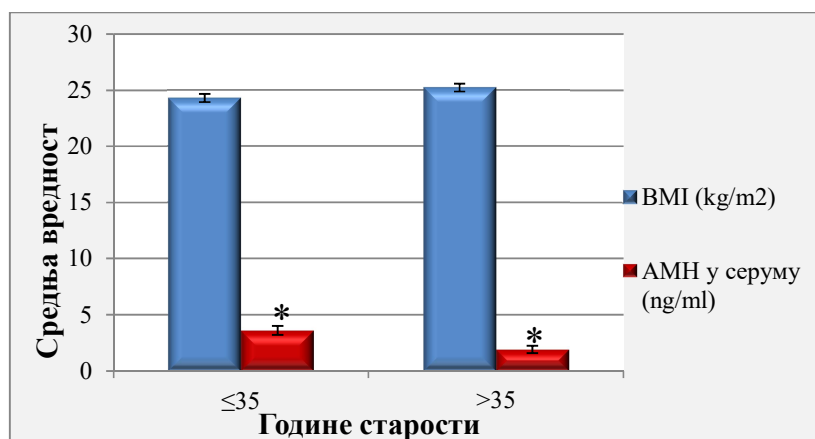
Mean - средња вредност; Min - минимална вредност; Max - Максимална вредност; SD - Стандардна девијација; *BMI* - Body mass index; *AMH* - Anti-müllerian hormone

Вредности *BMI* и серумског *AMH* у односу на године старости пацијенткиња дате су у Табели 4. Вредности показују да постоји статистички значајна разлика ($p=0,00$) за вредности серумског *AMH* између две групе пацијенткиња према Mann-Whitney *U* тесту (Графикон 1). Више вредности *AMH* у серуму забележене су код пацијенткиња које имају 35 и мање година, што је и очекивано.

Табела 4. Дистрибуција *BMI* и серумског *AMH* пацијенткиња по годинама старости

	Група А	Група Б
	N=46	N=74
<i>BMI</i> (kg/m ²)	24,31 ± 2,52	25,26 ± 2,71
серумски <i>AMH</i> (ng/ml)	3,60 ± 2,67*	1,91 ± 2,85*

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација; Група А: Пацијенткиње које имају ≤ 35 година; Група Б: Пацијенткиње које имају > 35 година; N - број пацијената у студијској групи; *BMI* - Body mass index; *AMH* - Anti-müllerian hormone; * $p < 0,05$ према Mann-Whitney *U* тесту



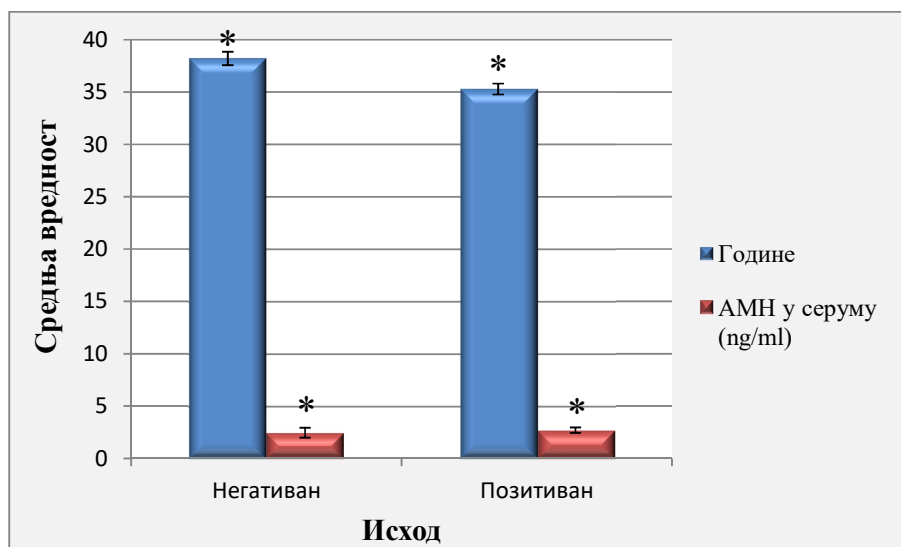
Графикон 1. *BMI* и *AMH* у серуму у односу на године старости пацијенткиња (Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка; * $p < 0,05$)

Године старости пацијенткиња, вредности *BMI* и концентрација серумског *AMH* у односу на исход процеса вантелесне оплодње дате су у Табели 5. На основу података приказаних у Табели 5 уочава се да су у групи са позитивним исходом биле пацијенткиње млађе старосне доби (статистички значајно, $p=0,001$) и са већим вредностима серумског *AMH* (статистички значајно, $p=0,003$) у односу на групу пацијенткиња са негативним исходом.

Табела 5. Године старости, *BMI* и *AMH* у серуму пацијенткиња на основу исхода процеса вантелесне оплодње

	Група А	Група Б
	N=60	N=60
Године ^(a)	38,2 ± 5,01*	35,28 ± 3,99*
<i>BMI</i> (kg/m ²) ^(b)	24,96 ± 2,63	24,83 ± 2,73
<i>AMH</i> у серуму (ng/ml) ^(b)	2,44 ± 3,58*	2,68 ± 2,01*

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација; Група А: Пацијенткиње са негативним исходом; Група Б: Пацијенткиње са позитивним исходом; N - број пацијената у студијској групи; *BMI* - Body mass index; *AMH* - Anti-müllerian hormone; ^a Independent Sample *T* тест; ^b Mann-Whitney *U* тест; * $p < 0,05$



Графикон 2. Године старости и концентрација *AMH* у серуму у односу на исход процеса вантелесне оплодње (Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка; * $p < 0,05$)

4.1.2. Карактеристике оваријалног одговора

Карактеристике оваријалног одговора на стимулацију су процењене на основу вредности естрадиола на дан завршне инјекције, броја и величине фоликула на дан завршне инјекције, као и броја добијених јајних ћелија и дате су у Табели 6.

Средња вредност естрадиола на дан стоп инјекције нам указује да би просечан број добијених јајних ћелија по пацијенткињи требало да се креће између 6 и 10, што је и доказано овим истраживањем. Резултати нам указују да је приликом аспирације јајних ћелија у 2/3 фоликула пронађена јајна ћелија.

Табела 6. Вредности параметара оваријалног одговора по пацијенткињи и у целокупном узорку од 120 пацијенткиња

	Mean	Median	Min	Max	SD
Естрадиол на дан завршне инјекције (pmol/L)	5618,02	5457,50	704,00	16071,0	3182,48
Број фоликула на дан завршне инјекције	12,61	11,00	1	90	9,95
Фоликули > 17mm	5,17	4,00	0	30	4,25
Фоликули < 17mm	7,48	6,00	0	60	6,86
Број јајних ћелија	8,22	7,00	1	30	5,77

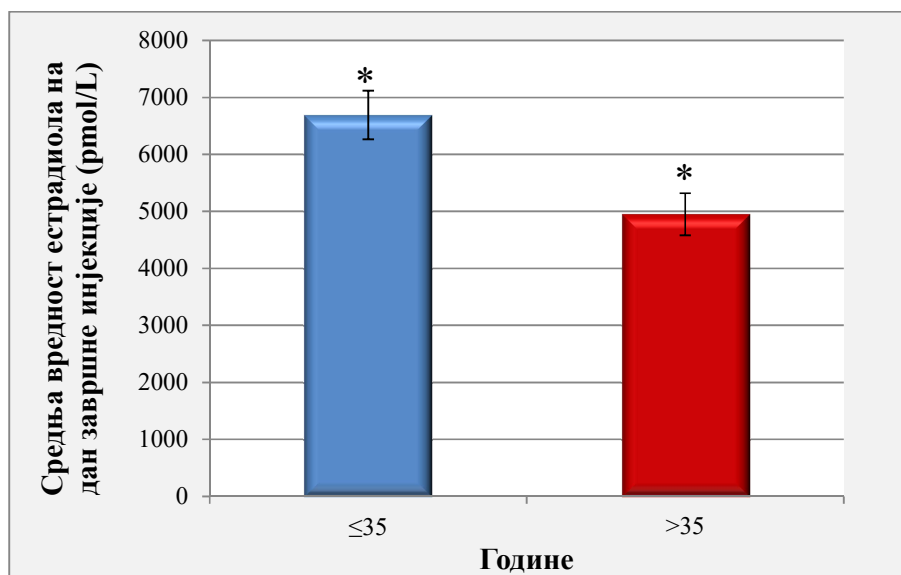
Mean - средња вредност; Min - Минимална вредност; Max - Максимална вредност; SD - Стандардна девијација;

Карактеристике оваријалног одговора у односу на године старости пацијенткиња су дате у Табели 7. Средње вредности свих параметара оваријалног одговора више су у групи А којој припадају млађе пацијенткиње у односу на групу Б којој припадају старије пацијенткиње. На графиконима 3 и 4 се јасно виде разлике у средњој вредности параметара оваријалног одговора између две групе пацијенткиња. Разлика у средњој вредности између две групе пацијенткиња за све параметре оваријалног одговора су статистички значајне према Mann-Whitney *U* тесту ($p > 0,05$) (естрадиол на дан завршне инјекције $p = 0,001$; број фоликула на дан завршне инјекције $p = 0,000$; фоликули већи од 17mm $p = 0,001$; фоликули мањи од 17mm $p = 0,000$ и број добијених јајних ћелија $p = 0,000$). Добijени резултати нам указују да млађе пацијенткиње боље реагују на стимулацију јајника.

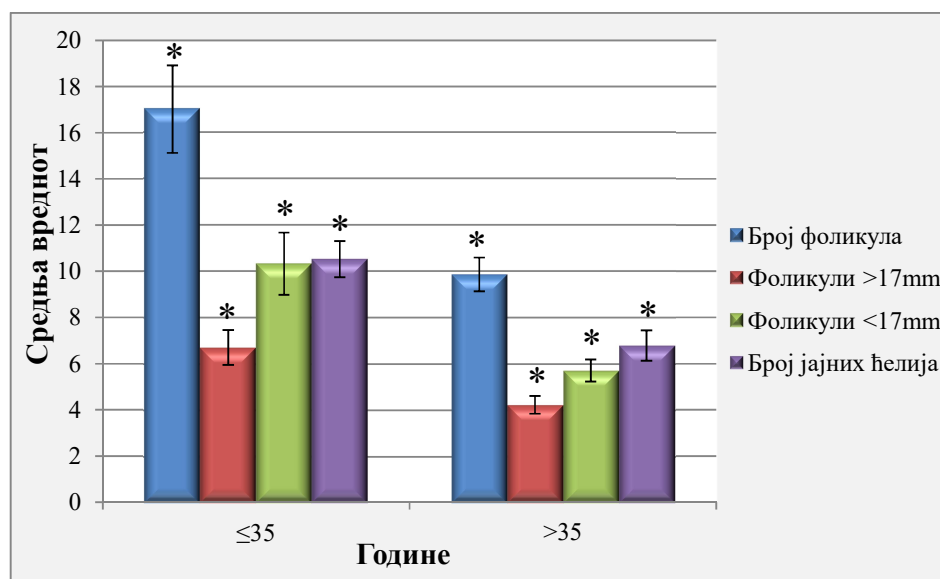
Табела 7. Дистрибуција вредности параметара оваријалног одговора по годинама старости пацијенткиња

	Група А N=46	Група Б N=74
Естрадиол на дан завршне инјекције (pmol/L)	6692,87 ± 2895,04*	4949,86 ± 3187*
Број фоликула на дан завршне инјекције	17,02 ± 12,87*	9,86 ± 6,28*
Фоликули >17mm	6,70 ± 5,10*	4,22 ± 3,32*
Фоликули <17mm	10,33 ± 9,15*	5,70 ± 4,10*
Број добијених ћелија	10,52 ± 5,29*	6,78 ± 5,62*

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација; Група А: Пацијенткиње који имају ≤35 година; Група Б: Пацијенткиње који имају >35 година; N - број пацијената у студијској групи; * статистичка значајност према Mann-Whitney U тесту;



Графикон 3. Средње вредности естрадиола на дан стоп инјекције у односу на године старости пацијенткиња (Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка; *p < 0,05)



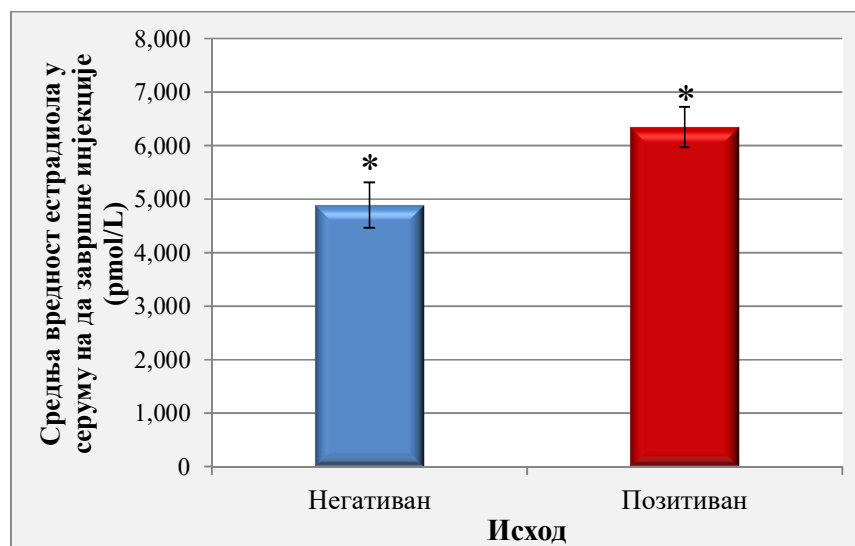
Графикон 4. Средње вредности броја фоликула, броја фоликула који су >17mm и <17mm и броја јајних ћелија у односу на године старости пацијенткиња (Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка; * $p < 0,05$)

У односу на исход процеса вантелесне оплодње средње вредности оваријалног одговора дате су у Табели 8. Резултати дати у Табели 8. показују да према Mann-Whitney U тесту постоји статистички значајна разлика средњих вредности параметара оваријалног одговора између две групе пацијенткиња које су подељене према исходу процеса вантелесне оплодње (естрадиол на дан завршне инјекције $p=0,003$; број фоликула на дан завршне инјекције $p=0,000$; фоликули већи од 17mm $p=0,001$; фоликули мањи од 17mm $p=0,000$ и број добијених јајних ћелија $p=0,000$). Све средње вредности параметара оваријалног одговора више су у групи Б којој припадају пацијенткиње са позитивним исходом. Средње вредности параметара оваријалног одговора су приказане и графички, као и статистичка значајност (графикон 5 и 6). Резултати нам показују да пацијенткиње које имају бољи одговор на стимулацију имају и веће шансе да остваре трудноћу.

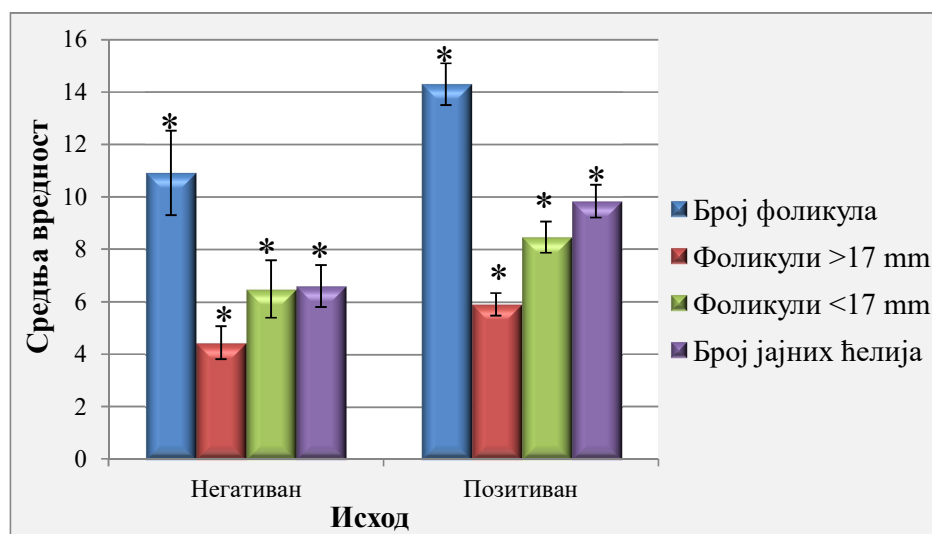
Табела 8. Дистрибуција вредности параметара оваријалног одговора у односу на исход процеса вантелесне оплодње

	Група А N=60	Група Б N=60
Естрадиол у серуму на дан завршне инјекције (pmol/L)	4889,19 ± 3294,73*	6346,87 ± 2914,16*
Број фоликула дан завршне инјекције (ком)	10,92 ± 12,49*	14,30 ± 6,15*
Фоликули >17mm	4,43 ± 4,91*	5,90 ± 3,35*
Фоликули <17mm	6,48 ± 8,48*	8,47 ± 4,60*
Број јајних ћелија	6,60 ± 6,18*	9,83 ± 4,86*

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација; Група А: Пацијенткиње са негативним исходом; Група Б: Пацијенткиње са позитивним исходом; N - број пацијената у студијској групи; *p* - статистичка значајност према Mann-Whitney *U* тесту; **p* < 0,05



Графикон 5. Средње вредности естрадиола на дан стоп инјекције у односу на исход процеса вантелесне оплодње (Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка; **p* < 0,05)



Графикон 6. Средње вредности укупног броја фоликула, фоликула који су >17mm и <17mm и средња вредност јајних ћелија у односу на исход процеса вантелесне оплодње (Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна грешка; * $p < 0,05$)

4.1.3. Квалитет јајних ћелија и успех фертилизације

На основу зрелости јајних ћелија пратили смо квалитет добијених јајних ћелија, а на основу оплодње проценат фертилизације. На основу претходно наведених морфолошких карактеристика у поглављу 1.6.1 све јајне ћелије су сврстане у четири категорије *MI*, *MII*, *GV* и *DG*. Фертилизација је оцењена на основу детаљне морфолошке анализе јајних ћелија на дан 1 која је објашњена у поглављу 1.6.1. У табели 9. су дати резултати који нам указују да је добијено више зрелих јајних ћелија од незрелих што се доводи у вези и са високим процентом фертилизације.

Табела 9. Квалитет јајних ћелија и успех фертилизације

	Mean	Median	Min	Max	SD
Број МII ћелија	6,70	6,00	0	27	4,83
Број MI ћелија	0,29	0,00	0	9	0,99
Број GV ћелија	0,95	0,00	0	12	1,91
Број DG ћелија	0,28	0,00	0	3	0,63
% квалитетних јајних ћелија	84,28	90,0	0	100	21,66
Оплођене јајне ћелије	4,96	5,00	0	20	3,60
Неоплођене јајне ћелије	3,22	2,00	0	15	3,32
% фертилизације	64,76	66,00	0	100	24,81

Mean - средња вредност; Min - Минимална вредност; Max - Максимална вредност; SD - Стандардна девијација; MII - зрела јајна ћелија која је у метафази II; MI - незрела јајна ћелија која је у метафази I; GV- јајна ћелија која је у профази I; DG - дегенерисана јајна ћелија.

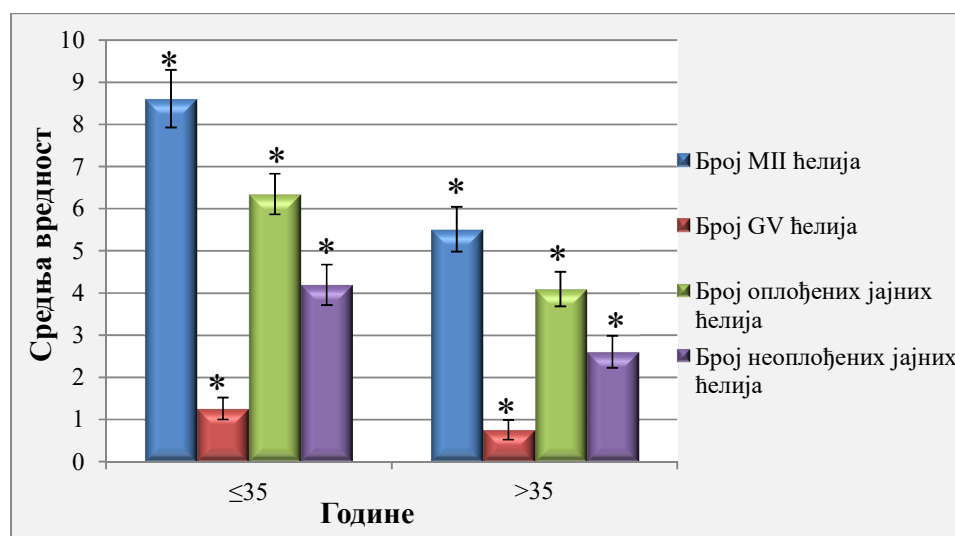
Карактеристике добијених јајних ћелија и успех фертилизације у односу на године старости пацијенткиња дате су у Табели 10. Резултати показују да постоји статистички значајна разлика у броју зрелих јајних ћелија ($p=0,000$), броју GV ћелија ($p=0,011$), броју оплођених јајних ћелија ($p=0,000$) и броју неоплођених јајних ћелија ($p=0,001$) између пацијенткиња које се разликују по годинама старости. Код млађих пацијенткиња је добијено више зрелих јајних ћелија, али и више GV ћелија. Исти однос је и када је у питању средња вредност броја оплођених и неоплођених јајних ћелија.

Као што је већ напоменуто у претходном поглављу, млађе пацијенткиње су имале бољи одговор на стимулацију, јер имају веће вредности серумског АМН (индикатор оваријалне резерве), а самим тим и већи број фоликула, што повлачи и већи број добијених јајних ћелија које су доброг квалитета (MII) способне за оплодњу.

Табела 10. Квалитет јајних ћелија и успех фертилизације у односу на године старости пацијенткиња

	Група А (N=46)	Група Б (N=74)
	Mean±SD	Mean±SD
Број МII ћелија	8,61 ± 4,64*	5,51 ± 4,59*
Број MI ћелија	0,35 ± 0,76	0,26 ± 1,11
Број GV ћелија	1,26 ± 1,76*	0,70 ± 1,99*
Број DG ћелија	0,28 ± 0,75	0,27 ± 0,55
% квалитетних ћелија	83,33 ± 18,88	86,86 ± 23,34
Број оплођених јајних ћелија	6,35 ± 3,28*	4,09 ± 3,55*
Број неоплођених јајних ћелија	4,20±3,26*	2,61±3,23*
% фертилизације	62,37±20,98	66,24±26,05

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација; Група А: Пацијенткиње које имају ≤35 година; Група Б: Пацијенткиње које имају >35 година; N - број пацијенткиња у студијској групи; МII - зрела јајна ћелија која је у метафази II; MI - незрела јајна ћелија која је у метафази I; GV - јајна ћелија која је у профази I; DG - морфолошки лоша јајна ћелија (дегенерисана); * статистичка значајност према Mann-Whitney U тесту, *p < 0,05.



Графикон 7. Број МII и GV ћелија, оплођених и неоплођене јајних ћелија по годинама старости пацијенткиња (Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка; *p < 0,05)

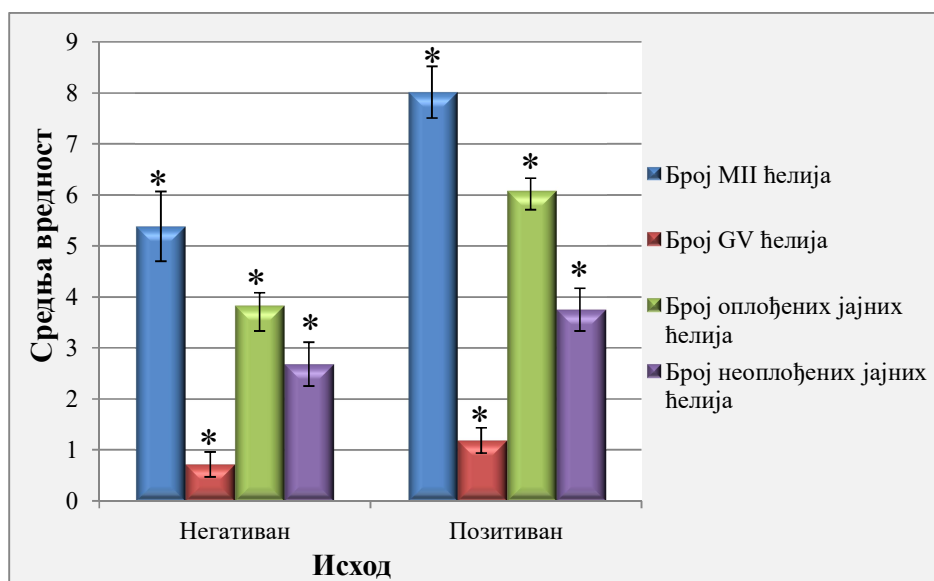
У Табели 11 дате су карактеристике јајних ћелија које су процењују на основу зрелости (број *MII*, *MI*, *GV* и *DG* ћелија, проценат квалитетних ћелија) и успех фертилизације (број оплођених и неоплођених јајних ћелија, проценат фертилизације) у односу на исход процеса вантелесне оплодње.

Статистичком анализом резултата испитиваних параметара према *Mann-Whitney U* тесту је потврђена статистички значајна разлика за: број *MII* ћелија ($p=0,000$), број *GV* ћелија ($p=0,016$), број оплођених јајних ћелија ($p=0,000$) и број неоплођених јајних ћелија ($p=0,011$) (Графикон 8). Више зрелих јајних ћелија (*MII* ћелије), али и не зрелих (*GV* ћелије) је добијено код пацијенткиња са позитивним исходом, као и број оплођених и неоплођених јајних ћелија. Један од циљева вантелесне оплодње је да се добије што више зрелих јајних ћелија (*MII* ћелије), како би се само најквалитетније узеле у даљу процедуру. Наши резултати указују на то да је исход процеса позитиван уколико се добије већи број јајних ћелија које су зреле, а самим тим већи је и број оплођених јајних ћелија.

Табела 11. Квалитет јајних ћелија и успех фертилизације у односу на исход процеса вантелесне оплодње

	Група А N=60	Група Б N=60
	Mean ± SD	Mean ± SD
Број <i>MII</i> ћелија	5,38 ± 5,31*	8,02 ± 3,93*
Број <i>MI</i> ћелија	0,28 ± 1,21	0,30 ± 0,72
Број <i>GV</i> ћелија	0,72 ± 1,89*	1,18 ± 1,92*
Број <i>DG</i> ћелија	0,22 ± 0,49	0,33 ± 0,75
% квалитетних ћелија	84,30 ± 25,65	84,25 ± 16,99
Број оплођених јајних ћелија	3,83 ± 3,89*	6,08 ± 2,91*
Број неоплођених јајних ћелија	2,68 ± 3,34*	3,75 ± 3,24*
% фертилизације	62,90±28,81	66,62±20,12

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација; Група А: Пацијенткиње са негативним исходом; Група Б: Пацијенткиње са позитивним исходом; N - број пацијенткиња у студијској групи; *MII* - зрела јајна ћелија која је у метафази II; *MI* - незрела јајна ћелија која је у метафази I; *GV*- јајна ћелија која је у профази I; *DG* - дегенерисана јајна ћелија; * статистичка значајност према *Mann-Whitney U* тесту, * $p < 0,05$.



Графикон 8. Средња вредност МII и GV ћелија, оплођених и неоплођених јајних ћелија на основу исхода процеса вантелесне оплодње (Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна грешка; * $p < 0,05$)

Примењене су две методе оплодње јајних ћелија *IVF* и *ICSI*, као и комбинација ових метода (*IVF/ICSI*). У Табели 12 је приказана заступљеност метода оплодње јајних ћелија по годинама старости пацијенткиња, док је у Табели 13 приказана заступљеност метода оплодње јајних ћелија у односу на исход процеса вантелесне оплодње. Не постоји статистички значајна разлика према *Pearson's Chi-square* тесту у примени ових метода када су у питању године пацијенткиња ($p=0,284$), ни када је у питању исход процеса вантелесне оплодње ($p=0,205$).

За оплодњу јајних ћелија и код млађих и код старијих пацијенткиња, као и код оних са позитивним и негативним исходом највише је примењивана *ICSI* метода. *ICSI* метода се примењује за лечење како женског тако и мушког инфертилитета, за разлику од *IVF* методе која се користи само за лечење женског инфертилитета зато је и мање заступљена.

Табела 12. Метода оплодње по годинама старости пацијенткиња

	Група А		Група Б	
	N=46	100 %	N=74	100%
Без јајних ћелија за оплодњу	0	0	2	2,6
IVF	5	10,9	3	4,1
ICSI	27	58,7	50	67,6
IVF/ICSI	14	30,4	19	25,7

		Група А		Група Б	
		N	%	N	%
Без јајних ћелија за оплодњу	N=2	0	2		
	100%	0	100		
IVF	N=8	5	3		
	100%	62,5	37,5		
ICSI	N=77	27	50		
	100%	35,1	64,9		
IVF/ICSI	N=33	14	19		
	100%	42,4	57,6		

Група А: Пацијенткиње које имају ≤ 35 година; Група Б: Пацијенткиње које имају > 35 година; N - број пацијенткиња у студијској групи; IVF- класична *in vitro fertilization*; ICSI - интрацитоплазматска инјекција сперматозоида.

Табела 13. Метода оплодње на основу исхода процеса вантелесне оплодње

	Група А		Група Б	
	N=60	100 %	N=60	100%
Без јајних ћелија за оплодњу	2	3,3	0	0,0
IVF	2	3,3	6	10,0
ICSI	41	68,3	36	60,0
IVF/ICSI	15	25,1	18	30,0

		Група А		Група Б	
		N=2	2	0	0
Без јајних ћелија за оплодњу	N=2	2	0		
	100%	100	0,0		
IVF	N=8	2	6		
	100%	25,0	75,0		
ICSI	N=77	41	36		
	100%	53,2	46,8		
IVF/ICSI	N=33	15	18		
	100%	45,5	54,5		

Група А: Пацијенткиње са негативним исходом; Група Б: Пацијенткиње са позитивним исходом; N - број пацијената у студијској групи; IVF - класична *in vitro fertilization*; ICSI - интрацитоплазматска инјекција сперматозоида

4.1.4. Квалитет ембриона

У Табели 14. је дата дескриптивна статистика карактеристика ембриона (број ембриона, број ембриона I класе, број ембриона II класе, број ембриона III класе и број ембриона IV класе). На основу резултата описаних у претходном поглављу можемо претпоставити да ћемо добити ембриона колико имамо и квалитетних јајних ћелија, што је и показано. Ембриона I класе је добијено 50% мање од броја оплођених јајних ћелија што се и очекује, јер деоба оплођених јајних ћелија зависи и од квалитета сперматозоида. Утицај квалитета сперматозоида на деобу није узета у обзир у овом истраживању, али је објашњен механизам у Уводу.

Табела 14. Карактеристике ембриона

	Mean	Median	Min	Max	SD
Број ембриона	5,33	5,00	0	20	3,35
Број ембриона I класе	2,98	2,00	0	16	2,66
Број ембриона II класе	1,02	0,00	0	7	1,45
Број ембриона III класе	0,18	0,00	0	4	0,54
Број ембриона IV класе	0,23	0,00	0	3	0,60
% ембриона I класе	65,14	74,00	0	100	35,51

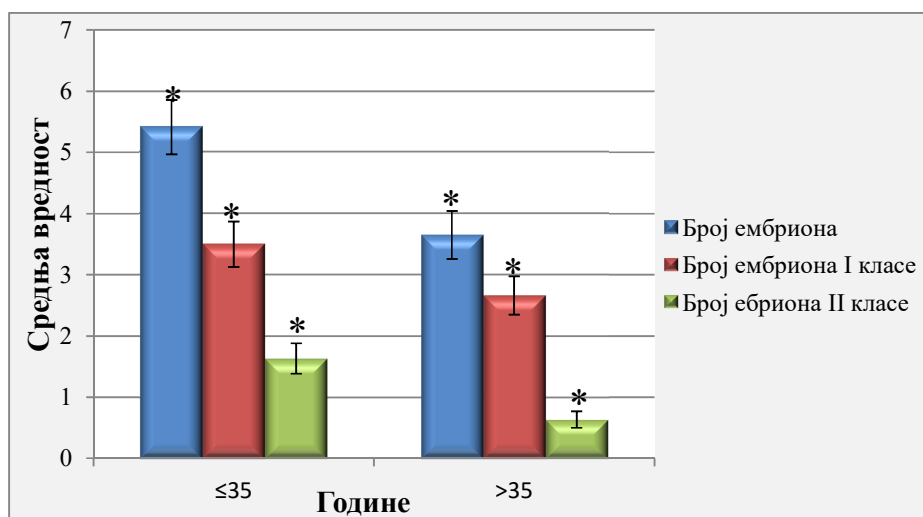
Mean - средња вредност; Min - Минимална вредност; Max - Максимална вредност; SD - Стандардна девијација.

Дистрибуција квалитета ембриона у односу на године старости пацијенткиња је дата у Табели 15. Према Mann-Whitney *U* тесту између две групе пацијенткиња које су подељене према годинама старости средње вредности броја добијених ембриона ($p=0,000$), број ембриона I класе ($p=0,022$) и број ембриона II класе ($p=0,000$) се статистички значајно разликују ($p<0,05$) (Графикон 9). Код млађих пацијенткиња је добијен већи број ембриона укупно, као и број ембриона I и II класе у односу на старије пацијенткиње. Млађе пацијенткиње имају квалитетније јајне ћелије самим тим у квалитетније ембрионе. Генерално млађе жене су доста здравије и имају организам који је краћи временски период изложен стресу и токсинима, због тога имају веће шансе за успехом.

Табела 15. Дистрибуција квалитета ембриона у односу на године старости пацијенткиња

	Група А N=46	Група Б N=74
Број добијених ембриона	5,41 ± 3,02*	3,65 ± 3,38*
Број ембриона I класе	3,50 ± 2,51*	2,66 ± 2,72*
Број ембриона II класе	1,63 ± 1,67*	0,64 ± 1,15*
Број ембриона III класе	0,24 ± 0,73	0,14 ± 0,38
Број ембриона IV класе	0,24 ± 0,52	0,22 ± 0,64
% ембриона I класе	67,84 ± 36,21	60,80 ± 34,32

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација; Група А: Пацијенткиње које имају ≤35 година; Група Б: Пацијенткиње које имају >35 година; N - број пацијенткиња у студијској групи; * статистичка значајност према Mann-Whitney *U* тесту, * $p < 0,05$.



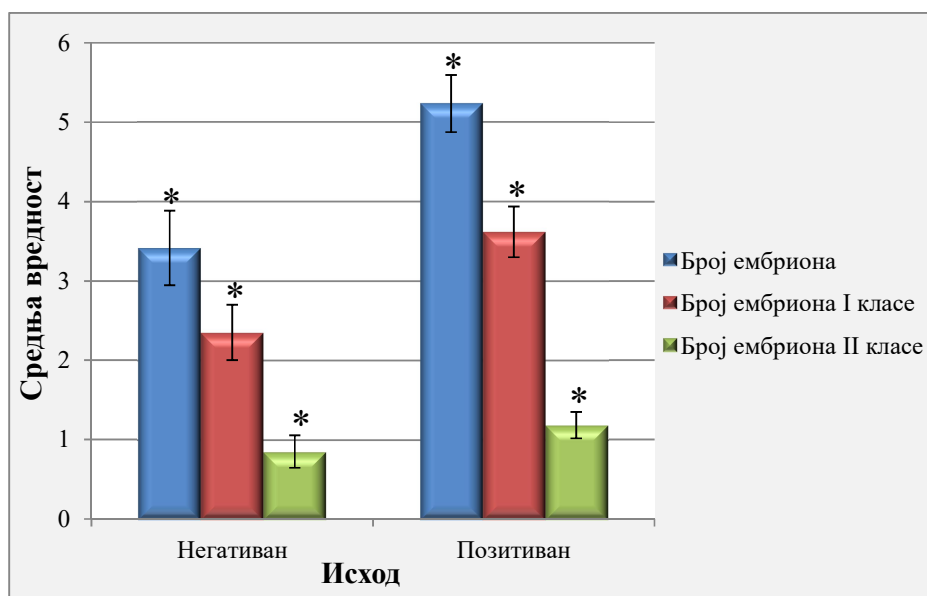
Графикон 9. Средња вредност добијених ембриона, ембриона I и II класе по годинама старости пацијенткиња (Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна грешка; * $p < 0,05$)

Карактеристике ембриона у односу на исход процеса вантелесне оплодње дате су у Табели 16. Према Mann-Whitney U тесту статистички значајна разлика је доказана између две групе пацијенткиња када су у питању следеће карактеристике ембриона: укупан број ембриона ($p=0,000$), број ембриона I класе ($p=0,001$) и број ембриона II класе ($p=0,024$) (Графикон 10). Код пацијенткиња са позитивним исходом процеса вантелесне оплодње добијен је већи број ембриона, као и ембриона I и II класе. Сходно томе можемо рећи да је за позитиван исход потребан већи број квалитетних ембриона како би била омогућена правилна селекција и одабир.

Табела 16. Квалитет ембриона и исход процеса вантелесне оплодње

	Група А N=60	Група Б N=60
Број добијених ембриона	3,42 \pm 3,63*	5,23 \pm 2,78*
Број ембриона I класе	2,35 \pm 2,71*	3,62 \pm 2,47*
Број ембриона II класе	0,85 \pm 1,59*	1,18 \pm 1,29*
Број ембриона III класе	0,22 \pm 0,64	0,13 \pm 0,43
Број ембриона IV класе	0,13 \pm 0,46	0,32 \pm 0,70
% ембриона I класе	63,02 \pm 40,15	87,27 \pm 35,52

Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација; Група А: Пацијенткиње са негативним исходом; Група Б: Пацијенткиње са позитивним исходом; N - број пацијенткиња у студијској групи; * статистичка значајност према Mann-Whitney U тесту; * $p < 0,05$.



Графикон 10. Просечан број добијених ембриона, број ембриона I и II класе по годинама старости пацијенткиња (Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна грешка; * $p < 0,05$)

Ембриотрансфер по препорукама ESHRE најидеалније је да се ради три или пет дана након аспирације јајних ћелија. У Табели 17. приказана је заступљеност трећег односно петог дана ембриотрансфера у целокупном узорку од 120 пацијенткиња.

До ембриотрансфера није дошло из неколико разлога: због хиперстимулације (тада се ембриони замрзавају), због застоја у деоби зигота или због лошег квалитета ембриона. У највећем броју случајева ембриотрансфер је рађен трећег дана од аспирације јајних ћелија.

Табела 17. Заступљеност ембриотрансфера на дан 3 односно на дан 5 у целокупном узорку од 120 пацијенткиња

Дан ембриотрансфера	N	%
Нема трансфера	13	10,8
Дан 3	84	70,0
Дан 5	23	19,2

N - број случајева; % - процентуална заступљеност

Заступљеност ембриотрансфера на дан 3. и дан 5. од аспирације јајних ћелија по годинама старости пацијенткиња дата је у Табели 18, а у односу на исход процеса вантелесне оплодње дата је у Табели 19.

Према *Pearson's Chi-square* тесту не постоји статистички значајна разлика у дану ембриотрансфера између две групе пацијенткиња у односу на године ($p=0,304$), док код пацијанткиња које су подељене у две групе у односу на исход процеса вантелесне оплодње постоји статистички значајна разлика у дану ембриотрансфера ($p=0,000$) (Графикон 11).

Када се сагледају резултати у свакој групи појединачно може се видети да се најчешће ембриотрансфер ради трећег дана и у групи пацијенткиња са негативним исходом као и у групи са позитивним исходом (горњи део табеле 19, горњи део графикана 11). У односу на исход процеса вантелесне оплодње показало се да је боље радити ембриотрансфер петог дана од дана аспирације (доњи део Табеле 19, доњи део графикана 11). Ембриони који се развију до петог дана у инкубаторима до стадијума бластоцисте имају веће шансе да се имплантирају у ендометријуму пацијенткиња, јер су бластоцисте отпорније на промену средине и имају већу стопу преживљавања.

Табела 18. Дан ембриотрансфера и године старости пацијенткиња

	Група А		Група Б	
	N=46	100 %	N=74	100%
Без трансфера	5	10,9	8	10,8
Дан 3	29	63,0	55	74,3
Дан 5	12	26,1	11	14,9

		Група А		Група Б	
		N=13	5	8	
Без трансфера	100%	38,5	61,5		
Дан 3	N=84	29	55		
	100%	34,5	65,5		
Дан 5	N=23	12	11		
	100%	52,2	47,8		

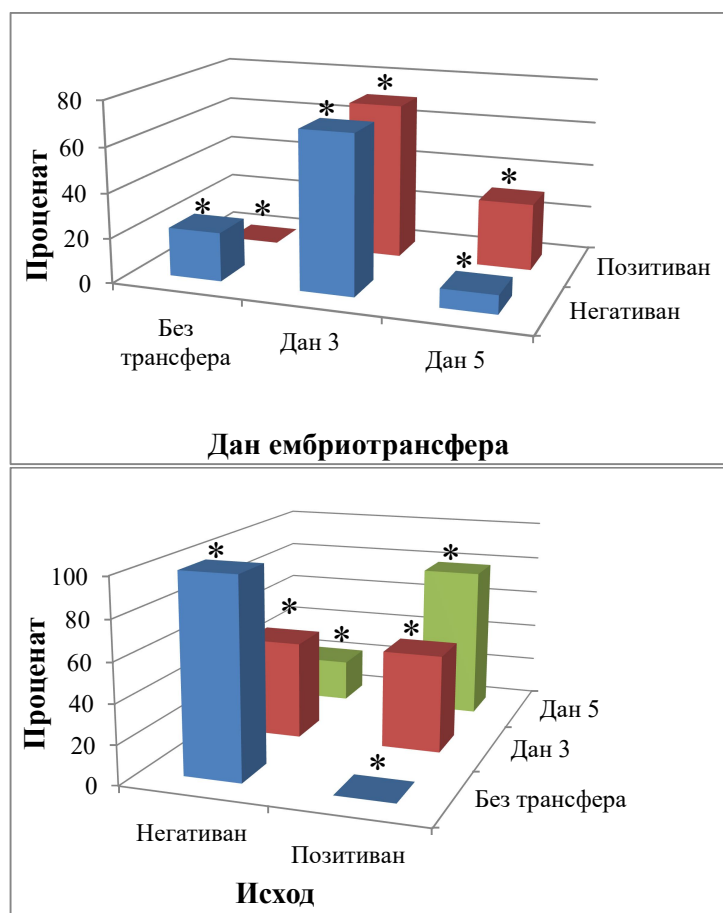
Група А: Пацијенткиње које имају ≤ 35 година; Група Б: Пацијенткиње које имају >35 година.

Табела 19. Дан трансфера и исход процеса вантелесне оплодње

	Група А		Група Б	
	N=60	100 %	N=60	100%
Без трансфера	13*	21,7	0*	0
Дан 3	42*	70,0	42*	70,0
Дан 5	5*	8,3	18*	30,0

		Група А		Група Б	
Без трансфера	N=13	13*	0*		
	100%	100	0		
Дан 3	N=84	42*	42*		
	100%	50,0	50,0		
Дан 5	N=23	5*	18*		
	100%	21,7	78,3		

Група А: Пацијенткиње са негативним исходом; Група Б: Пацијенткиње са позитивним исходом; N - број пацијенткиња у студијској групи; * статистичка значајност према Pearson's Chi-square тесту; *p < 0,05.



Графикон 11. Однос између дана трансфера и исхода вантелесне оплодње (Резултати су изражени у процентима, * $p < 0,05$)

4.1.5. Исход процеса вантелесне оплодње

Исход процеса вантелесне оплодње у односу на целокупан број пацијенткиња које су учествовале у студији (N=120) дат је у Табели 20, као и да ли је настала трудноћа била биохемијска или је и клинички потврђена.

Наши резултати указују на висок проценат успешности процеса вантелесне оплодње, који је чак изнад Европског просека (према ESHRE европски просек успешности је око 30%). Такође наши резултати указују и на висок проценат клинички доказаних трудноћа.

Табела 20. Исход процеса вантелесне оплодње и трудноће у целокупном узорку од 120 пацијената

		N	%
Исход	Позитиван	60	50
	Негативан	60	50
Трудноћа	Нема је	60	50
	Биохемијска	10	8
	Клиничка	50	42

N - број узорака у студијској групи; % - процентуална заступљеност

Исход процеса вантелесне оплодње по годинама старости пацијенткиња које су учествовале у студији приказан је у Табели 21.

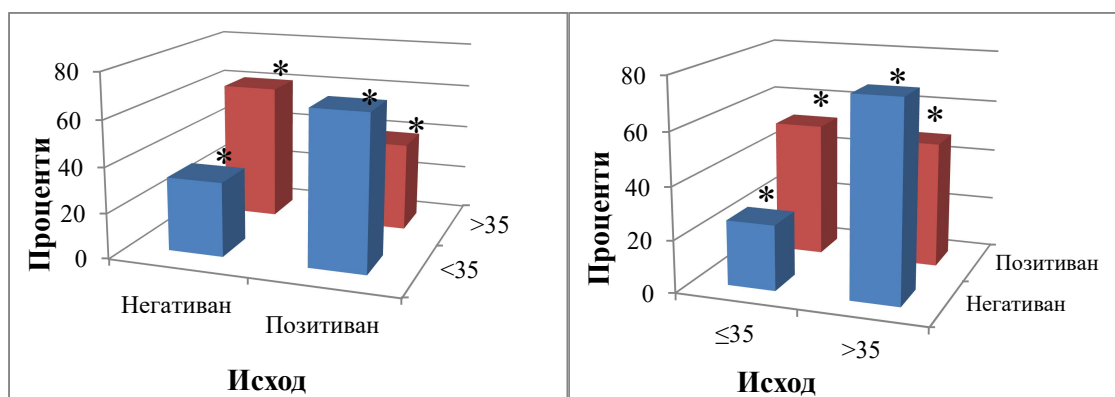
Према *Pearson's Chi-square* тесту постоји статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у исходу између две групе пацијенткиња по годинама старости ($p = 0,003$) (графикон 12). Код млађих пацијенткиња исход је повољнији у знатно већем проценту у односу на старије пацијенткиње. Овакви резултати су очекивани, са годинама се смањује проценат успешности вантелесне оплодње (тело са годинама стари, као и саме јајне ћелије, што је тело дуже изложено утицајима из спољашње средине то је мањи квалитет јајних ћелија и насталих ембриона, смањује се и имплантациони потенцијал ендометријума).

Табела 21. Исход процеса вантелесне оплодње по годинама старости пацијенткиња

		Група А		Група Б	
		N=46	100%	N=74	100%
Исход	Негативан	15	32,6	45	60,8
	Позитиван	31	67,4	29	39,2

		Група А		Група Б	
Исход	Негативан	N=60	15	45	
		100%	25,0	75,0	
	Позитиван	N=60	31	29	
		100%	51,7	48,3	

Група А: Пацијенткиње које имају ≤ 35 година; Група Б: Пацијенткиње које имају > 35 година;



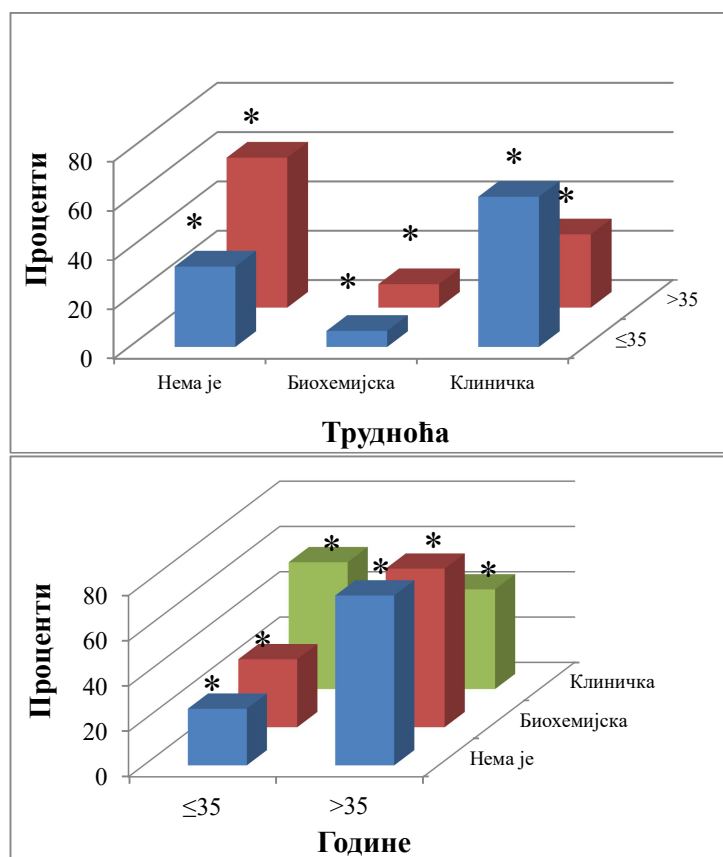
Графикон 12. Исход процеса вантелесне оплодње по годинама старости пацијенткиња (Резултати су изражени у процентима, * $p < 0,05$)

У Табели 22. приказан је однос потврђених трудноћа по годинама старости пацијенткиња. Према *Pearson's Chi-square* тесту постоји статистички значајна разлика у потврђеним трудноћама између две групе када су у питању године старости пацијенткиња ($p=0,003$). Код млађих пацијенткиња чешће је потврђена клиничка трудноћа у односу на старије пацијенткиње, док је биохемијска трудноћа чешће потврђена код старијих пацијенткиња.

Табела 22. Клиничка и биохемијска трудноћа по годинама старости пацијенткиња

		Група А		Група Б	
		N=46	100%	N=74	100%
Трудноћа	Нема је	15*	32,6*	45*	60,8*
	Биохемијска	3*	6,5*	7*	9,5*
	Клиничка	28*	60,9*	22*	29,7*
		Група А		Група Б	
Трудноћа	Нема је	N=60	15*	45*	
		100%	25,0*	75,0*	
	Биохемијска	N=10	3*	7*	
		100%	30,0*	70,0*	
	Клиничка	N=50	28*	22*	
		100%	56,0*	44,0*	

Група А: Пацијенткиње које имају ≤ 35 година; Група Б: Пацијенткиње које имају >35 година; * статистичка значајност према *Pearson's Chi-square* тесту; * $p < 0,05$.



Графикон 13. Клиничка и биохемијска трудноћа по годинама старости пацијенткиња (Резултати су изражени у процентима, * $p < 0,05$)

4.2. Састав фоликуларне течности

Дескриптивна статистика параметара одређиваних у фоликуларној течности за време извођења студије дата је у Табели 23. У фоликуларној течности одређивана је концентрација следећих параметара: естрадиол, прогестерон, *FSH*, тестостерон, *AST*, *ALT*, *ALP*, *LDH*, *IL-6*, *Fe*, *K*, *Na*, *Ca* и *Mg*.

Табела 23. Параметри у фоликуларној течности у целокупном узорку од 120 пацијенткиња

	Mean	Median	Min	Max	SD
Естрадиол (pg/ml)	2342818,30	1020119,00	43343	46268222	6114676,403
Прогестерон (ng/ml)	40802,89	7542,54	620	1379380	204761,63
FSH (mIU/ml)	4,72	3,89	0,56	18,81	3,12
Тестостерон (ng/ml)	4,49	4,27	0,98	13,33	1,89
AST (IU/l)	17,46	16,50	5	92	9,59
ALT (IU/l)	8,83	8,00	1	43	5,70
ALP (U/l)	19,05	16,50	2	74	11,07
LDH (U/l)	246,59	234,50	46	818	105,68
IL-6 (ng/ml)	6,59	5,35	1,05	43,74	6,29
Гвожђе (umol/l)	6,98	6,05	0,50	17,30	3,60
Калијум (mmol/l)	4,88	4,90	4,10	5,90	0,41
Натријум (mmol/l)	152,54	151,00	135	186	10,08
Калцијум (mmol/l)	2,30	2,29	1,96	2,77	0,16
Магнезијум (mmol/l)	0,55	0,56	0,21	0,94	0,14

Mean - средња вредност; Min - минимална вредност; Max - максимална вредност; SD - стандардна девијација; FSH - фоликулостимулирајући хормон; AST - аспартат аминотрансфераза; ALT - аланин аминотрансфераза; ALP - алкална фосфатаза; LDH - лактат дехидрогеназа; IL-6 - интерлеукин 6.

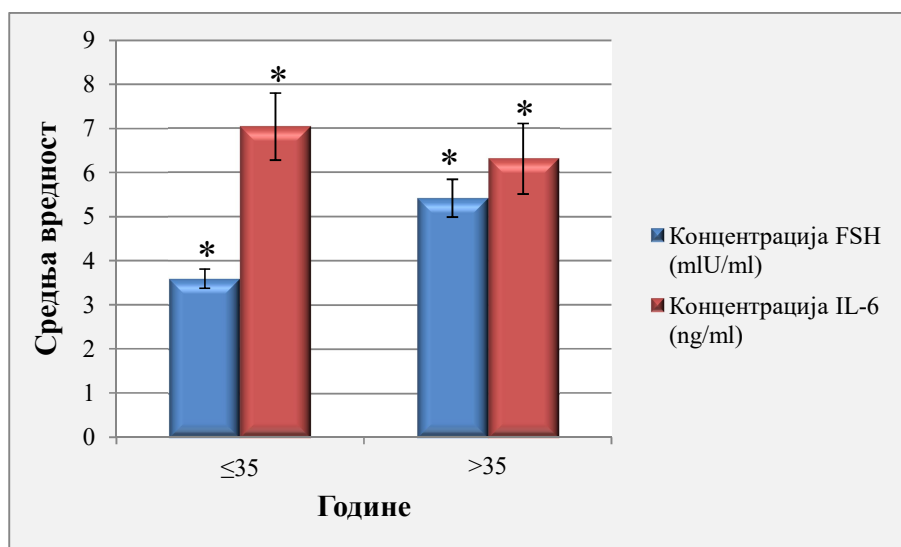
Средње вредности одређиваних параметара у фоликуларној течности у односу на године старости пацијенткиња дате су у Табели 24.

Према *Mann-Whitney U* тесту статистички значајна разлика ($p < 0,05$) је потврђена између две групе пацијенткиња које се разликују по годинама за *FSH* ($p = 0,006$) и *IL-6* ($p = 0,014$), што је представљено на графикону 14.

Табела 24. Дистрибуција концентрација одређиваних параметара у фоликуларној течности у односу на године старости пацијенткиња

	Група А N=46	Група Б N=74
Естрадиол (pg/ml)	2996334,14±8972767,95	1936578,73±3299002,22
Прогестерон (ng/ml)	33159,09±172187,63	45554,45±223631,52
FSH (mIU/ml)	3,59±1,41*	5,41±3,64*
Тестостерон (ng/ml)	4,40±1,94	4,54±1,87
AST (IU/l)	18,96±13,17	16,53±6,37
ALT (IU/l)	8,35±5,66	9,14±5,74
ALP (U/l)	19,85±13,41	18,55±9,40
LDH (U/l)	264,11±133,43	235,70±83,17
IL-6 (ng/ml)	7,04±5,17*	6,31±6,91*
Гвожђе (umol/l)	6,71±3,38	7,00±3,74
Калијум (mmol/l)	4,91±0,45	4,86±0,38
Натријум (mmol/l)	153,04±11,31	152,23±9,31
Калцијум (mmol/l)	2,31±0,19	2,29±0,15
Магнезијум (mmol/l)	0,54±0,15	0,56±0,14

Резултати су приказани као средња вредност±стандардна девијација; Група А: Пацијенткиње које имају ≤35 година; Група Б: Пацијенткиње које имају >35 година; FSH - фоликулостимулирајући хормон; AST - аспартат аминотрансфераза; ALT - аланин аминотрансфераза; ALP - алкална фосфатаза; LDH - лактат дехидрогеназа; IL-6 - интерлеукин 6; *статистичка значајност према Mann-Whitney U тесту; *p < 0,05.



Графикон 14. Дистрибуција концентрација FSH и IL-6 параметара у фоликуларној течности у односу на године старости пацијенткиња (Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна грешка; * $p < 0,05$)

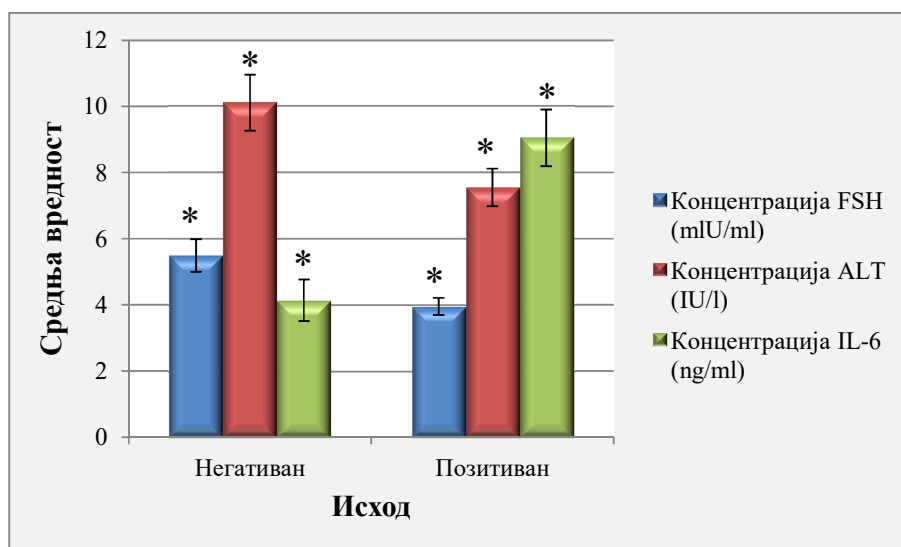
Средње вредности концентрација испитиваних параметара у фоликуларној течности у односу на исход процеса вантелесне оплодње дате су у Табели 25.

Према *Mann-Whitney U* тесту статистички значајна разлика ($p < 0,05$) је потврђена између две групе пацијенткиња у односу на исход процеса вантелесне оплодње за *FSH* ($p=0,006$), *ALT* ($p=0,004$) и *IL-6* ($p=0,014$) (Графикон 15).

Табела 25. Дистрибуција концентрација одређиваних параметара у фоликуларној течности у односу на исход процеса вантелесне оплодње

	Група А N=60	Група Б N=60
Естрадиол (pg/ml)	2574203,62±6634366,70	2111432,99±5593615,70
Прогестерон (ng/ml)	50640,45±230226,28	30965,34±177099,70
FSH (mIU/ml)	5,48±3,81*	3,94±1,98*
Тестостерон (ng/ml)	4,48±1,86	4,50±1,94
AST (IU/l)	18,47±11,66	16,45±6,89
ALT (IU/l)	10,12±6,55*	7,55±4,40*
ALP (U/l)	19,57±11,83	18,53±10,33
LDH (U/l)	254,75±100,43	238,43±110,93
IL-6 (ng/ml)	4,13±4,86*	9,05±6,62*
Гвожђе (umol/l)	7,30±4,04	6,48±3,07
Калијум (mmol/l)	4,91±0,41	4,86±0,41
Натријум (mmol/l)	153,88±10,66	151,20±9,37
Калцијум (mmol/l)	2,31±0,17	2,28±0,16
Магнезијум (mmol/l)	0,57±0,15	0,54±0,13

Резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка; Група А: Пацијенткиње са негативним исходом; Група Б: Пацијенткиње са позитивним исходом; FSH - фоликулостимулирајући хормон; AST - аспартат аминотрансфераза; ALT - аланин аминотрансфераза; ALP - алкална фосфатаза; LDH - лактат дехидрогеназа; IL-6 - интерлеукин 6; N- број пацијената у студијској групи; *статистичка значајност према Mann-Whitney U тесту; *p < 0,05.



Графикон 15. Дистрибуција концентрација FSH, ALT и IL-6 параметара у фоликуларној течности у односу на исход процеса вантелесне оплодње (Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна грешка; * $p < 0,05$)

4.2.1. Корелација састава фоликуларне течности и година старости, BMI и серумског AMH

Корелациона анализа параметара фоликуларне течности и година старости, BMI и серумског AMH дата је у Табели 26.

Статистички значајна корелација је примећена између вредности хормона естрадиола, прогестерона и FSH у фоликуларној течности и вредности серумског AMH и то у негативном смеру (веће вредности хормона у фоликуларној течности прате ниже вредности серумског AMH и обрнуто). Коефицијенти корелације нам указују да је веза између вредности естрадиола и прогестерона у фоликуларној течности и вредности серумског AMH мале јачине, док је коефицијент између вредности FSH у фоликуларној течности и вредности серумског AMH знатно виши и указује на јаку везу.

Статистички значајна корелација је утврђена и између вредности FSH, AST и калцијума у фоликуларној течности и година старости пацијенткиња. Корелација је позитивног смера између вредности FSH у фоликуларној течности и година старости пацијенткиња (веће вредности FSH у фоликуларној течности прате више године старости и обрнуто), док је између вредности AST и калцијума у фоликуларној течности и година старости пацијенткиња негативног смера (веће вредности AST/калцијума у фоликуларној течности прате ниже године старости и обрнуто). Коефицијент корелације нам указује на малу јачину везе.

Статистички значајна корелација је утврђена и између вредности IL-6 у фоликуларној течности и година старости пацијенткиња, као и између вредности IL-6 и вредности серумског AMH. Корелација између вредности IL-6 у фоликуларној течности и година старости пацијенткиња је негативног смера (веће вредности IL-6 у фоликуларној течности прате мање године старости пацијенткиња и обрнуто), док је

корелација позитивног смера између вредности *IL-6* у фоликуларној течности и вредности *AMH* у серуму (више вредности *IL-6* у фоликуларној течности прате више вредности *AMH* у серуму и обрнуто). Коefицијенти корелације нам указују на средњу јачину везе.

Када је у питању *BMI* једина статистички значајна корелација је утврђена са концентрацијом гвожђа у фоликуларној течности, негативног смера (већа концентрација гвожђа у фоликуларној течности прати ниже вредности *BMI*), коefицијент корелације нам указује на слабу везу.

Табела 26. Корелација одређиваних параметара из фоликуларне течности и година старости, *BMI* и *AMH* у серуму

	Године		<i>BMI</i>		серумски <i>AMH</i>	
	r/rho	<i>p</i>	r/rho	<i>p</i>	r/rho	<i>p</i>
Естрадиол (pg/ml)	0,174 ²	0,058	0,064 ²	0,487	-0,264²	0,004
Прогестерон (ng/ml)	0,135 ²	0,140	0,015 ²	0,874	-0,211²	0,021
FSH (mIU/ml)	0,275²	0,002	-0,007 ²	0,939	-0,530²	0,000
Тестостерон (ng/ml)	0,085 ²	0,357	0,036 ²	0,092	0,161 ²	0,080
AST (IU/l)	-0,180²	0,049	-0,145 ²	0,114	0,065 ²	0,482
ALT (IU/l)	0,099 ²	0,281	0,118 ²	0,199	-0,136 ²	0,139
ALP (U/l)	0,028 ²	0,765	0,127 ²	0,170	0,006 ²	0,945
LDH (U/l)	-0,103 ²	0,264	-0,154 ²	0,092	0,046 ²	0,617
<i>IL-6</i> (ng/ml)	-0,324²	0,000	-0,024 ²	0,795	0,330²	0,000
Гвожђе (umol/l)	-0,010 ¹	0,917	-0,182¹	0,046	-0,048 ²	0,602
Калијум (mmol/l)	-0,094 ¹	0,308	-0,019 ¹	0,839	0,164 ²	0,073
Натријум (mmol/l)	-0,131 ¹	0,154	-0,029 ¹	0,754	0,131 ²	0,153
Калцијум (mmol/l)	-0,205¹	0,024	-0,037 ¹	0,668	0,163 ²	0,076
Магнезијум (mmol/l)	0,022 ¹	0,816	-0,099 ¹	0,283	-0,098 ²	0,288

BMI - Body mass index; *AMH* - Anti-müllerian hormone; FSH - фоликулостимулирајући хормон; AST - аспартат аминотрансфераза; ALT - аланин аминотрансфераза; ALP- алкална фосфатаза; LDH - лактат дехидрогеназа; *IL-6* - интерлеукин 6; *r* - Пирсонов коefицијент корелације; rho - Спирманов коefицијент корелације; *p* - статистичка значајност; ¹Пирсонов коefицијент корелације; ²Спирманов коefицијент корелације; Статистички значајне корелације су затамњене.

4.2.2. Корелација састава фоликуларне течности и карактеристике оваријалног одговора

Корелациона анализа између одређиваних параметара у фоликуларној течности и карактеристика оваријалног одговора (естрадиол на дан завршне инјекције, број фоликула и број јајних ћелија) дата је у Табели 27.

Статистички значајна корелација је утврђена између вредности *FSH* у фоликуларној течности и вредности естрадиола у серуму на дан завршне инјекције, такође између вредности *FSH* у фоликуларној течности и броја фоликула и *FSH* у фоликуларној течности и броја јајних ћелија. Смер корелације је негативан, што значи да више вредности *FSH* у фоликуларној течности прате ниже вредности естрадиола у серуму на дан завршне инјекције, број фоликула и број јајних ћелија и обрнуто. Коефицијенти корелације нам указују на средње јаку везу између вредности *FSH* у фоликуларној течности и вредности естрадиола у серуму на дан завршне инјекције, док за вредности *FSH* у фоликуларној течности и броја фоликула и јајних ћелија указује на јаку везу.

Што се тиче вредности тестостерона у фоликуларној течности, статистички значајна корелација је утврђена само за број јајних ћелија, смер корелације је негативан (више вредности тестостерона у фоликуларној течности прате мањи број јајних ћелија), коефицијент корелације указује на везу која је средње јака.

Када су у питању ензими, статистички значајна корелација је доказана између вредности *AST* у фоликуларној течности и броја фоликула, између вредности *ALT* у фоликуларној течности и броја јајних ћелија, док вредност *LDH* у фоликуларној течности корелира и са бројем фоликула и са бројем јајних ћелија. Негативан смер корелације примећује се једино између вредности *ALT* у фоликуларној течности и броја јајних ћелија (више вредности *ALT* у фоликуларној течности прате мањи број јајних ћелија и обнуто), све остале корелације имају позитивни смер (више вредности прате више вредности). Што се тиче коефицијента корелације једина јака веза је између вредности *AST* у фоликуларној течности и броја фоликула.

Статистички значајна корелација је доказана између вредности *IL-6* у фоликуларној течности и вредности сва три параметра којима смо пратили оваријални одговор (естрадиол у серуму на дан завршне инјекције, број фоликула и број јајних ћелија). Смер корелације је позитиван (више вредности *IL-6* у фоликуларној течности прате више вредности сва три параметра којима смо пратили оваријални одговор). Коефицијент корелације нам указује да је веза између вредности *IL-6* у фоликуларној течности и вредности естрадиола у серуму на дан завршне инјекције мала, док је веза између вредности *IL-6* у фоликуларној течности и броја фоликула и јајних ћелија средње јака.

Од биоелемената у фоликуларној течности статистички значајна корелација је доказана између вредности калијума у фоликуларној течности и броја фоликула (слаба веза; позитиван смер) и вредности калијума и броја јајних ћелија (слаба веза; позитиван смер), затим између вредности натријума у фоликуларној течности и сва три параметра којима смо пратили оваријални одговор (естрадиол на дан завршне инјекције (слаба веза; позитиван смер), број фоликула (средње јака веза; позитиван смер) и броја јајних ћелија (слаба веза; позитиван смер) и између вредности калцијума у фоликуларној

течности и броја фоликула (средње јака веза; позитиван смер) и броја јајних ћелија (слаба веза; позитиван смер).

Табела 27. Корелација одређиваних параметара из фоликуларне течности и карактеристике оваријалног одговора

	Естрадиол у серуму на дан завршне инјекције		Број фоликула		Број јајних ћелија	
	r/rho	<i>p</i>	r/rho	<i>p</i>	r/rho	<i>p</i>
Естрадиол (pg/ml)	0,900 ¹	0,329	-0,020 ¹	0,824	-0,034 ¹	0,713
Прогестерон (ng/ml)	0,053 ¹	0,566	0,001 ¹	0,992	0,048 ¹	0,605
FSH (mIU/ml)	-0,332²	0,000	-0,600²	0,000	-0,573²	0,000
Тестостерон (ng/ml)	-0,120 ¹	0,190	-0,153 ¹	0,095	-0,253¹	0,005
AST (IU/l)	0,009 ¹	0,924	0,561¹	0,000	0,119 ¹	0,197
ALT (IU/l)	-0,172 ²	0,060	-0,086 ¹	0,350	-0,217²	0,017
ALP (U/l)	0,026 ²	0,778	-0,012 ²	0,895	-0,037 ²	0,411
LDH (U/l)	0,117 ²	0,204	0,365¹	0,000	0,220¹	0,016
IL-6 (ng/ml)	0,257²	0,005	0,399²	0,000	0,420²	0,000
Гвожђе (umol/l)	-0,074 ¹	0,420	-0,058 ²	0,582	-0,097 ¹	0,294
Калијум (mmol/l)	0,110 ¹	0,230	0,242¹	0,008	0,226¹	0,013
Натријум (mmol/l)	0,199¹	0,029	0,315¹	0,000	0,192¹	0,036
Калцијум (mmol/l)	0,113 ¹	0,218	0,309¹	0,001	0,228¹	0,012
Магнезијум (mmol/l)	-0,036 ¹	0,693	0,093 ²	0,312	-0,083 ¹	0,369

FSH - фоликулостимулирајући хормон; AST - аспартат аминотрансфераза; ALT - аланин аминотрансфераза; ALP - алкална фосфатаза; LDH - лактат дехидрогеназа; IL-6 - интерлеукин 6; r - Пирсонов коефицијент корелације; rho - Спирманов коефицијент корелације; *p* - статистичка значајност; ¹Пирсонов коефицијент корелације; ²Спирманов коефицијент корелације; Статистички значајне корелације су затамњене.

4.2.3. Корелација састава фоликуларне течности и квалитет јајних ћелија и успех фертилизације

Корелациона анализа између параметара одређиваних у фоликуларној течности и квалитета јајних ћелија (број *MII* ћелија и проценат *MII* ћелија) и успеха фертилизације (оплођене јајне ћелије и проценат фертилизације) дата је у Табели 28.

Статистички значајна корелација је доказана између вредности *FSH* у фоликуларној течности и квалитета јајних ћелија (*MII* и проценат *MII* ћелија), као и између вредности *FSH* у фоликуларној течности и успеха фертилизације (оплођене јајне ћелија) и процента фертилизације. Позитиван смер корелације је само између вредности *FSH* у фоликуларној течности и проценат фертилизације (више вредности *FSH* у фоликуларној течности прате већи проценат фертилизације). Негативан смер нам указује да више вредности *FSH* у фоликуларној течности прате мањи број *MII* ћелија, мањи проценат *MII* ћелија и мањи број оплођених јајних ћелија. Коефицијент корелације показује јаку везу између вредности *FSH* у фоликуларној течности и броја *MII* ћелија.

Такође, статистички значајну корелацију показују и вредности тестостерона и *ALT* у фоликуларној течности са бројем *MII* ћелија и бројем оплођених јајних ћелија. Коефицијент корелације за вредности тестостерона и *MII* ћелија указује на негативан смер корелације (веће вредности тестостерона у фоликуларној течности прате мањи број *MII* ћелија и обрнуто) и да постоји јака веза између ова два параметра, кофицијент за вредности тестостерона и оплођених јајних ћелија указује на негативан смер корелације и на слабу везу. Што се тиче вредности *ALT* у фоликуларној течности коефицијенти корелације за *MII* ћелије и за број оплођених јајних ћелија нам указују да је негативан смер корелације (више вредности *ALT* у фоликуларној течности прате мањи број *MII* ћелија и мањи број оплођених јајних ћелија и обрнуто) и да је јачина везе слаба.

Статистички значајна корелација је доказана између вредности *IL-6* у фоликуларној течности и *MII* ћелија и оплођених јајних ћелија. Смер корелације је позитиван (веће вредности *IL-6* у фоликуларној течности прате већи број *MII* ћелија и већи број оплођених јајних ћелија). Коефицијент корелације нам указује да је веза између вредности *IL-6* и *MII* ћелија/ оплођених јајних ћелија средње јака.

Табела 28. Корелација одређиваних параметара из фоликуларне течности и квалитет јајних ћелија и успех фертилизације

	Број МИ		% МИ ћелија		Број оплођених јајних ћелија		% фертилизације	
	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p
Естрадиол (pg/ml)	-0,066 ¹	0,474	-0,033 ¹	0,721	-0,093 ¹	0,310	-0,086 ¹	0,348
Прогестерон (ng/ml)	-0,052 ¹	0,574	-0,091 ¹	0,325	-0,090 ¹	0,331	-0,132 ¹	0,150
FSH (mIU/ml)	-0,505²	0,000	-0,345²	0,000	-0,490²	0,000	0,248²	0,006
Тестостерон (ng/ml)	-0,268¹	0,003	0,091 ¹	0,323	-0,236¹	0,010	0,134 ¹	0,146
AST (IU/l)	0,014 ¹	0,877	0,008 ²	0,929	-0,021 ¹	0,821	0,029 ²	0,752
ALT (IU/l)	-0,280²	0,002	0,084 ²	0,360	-0,284²	0,002	0,047 ²	0,610
ALP (U/l)	-0,118 ²	0,198	0,036 ²	0,698	-0,082 ²	0,371	0,025 ²	0,789
LDH (U/l)	0,029 ²	0,754	-0,054 ²	0,555	0,007 ²	0,939	-0,055 ²	0,552
IL-6 (ng/ml)	0,407²	0,000	-0,162 ¹	0,078	0,475²	0,000	0,056 ²	0,478
Гвожђе (umol/l)	-0,206 ²	0,024	-0,040 ²	0,666	0,141 ²	0,125	0,070 ²	0,445
Калијум (mmol/l)	0,149 ²	0,104	-0,134 ²	0,146	0,116 ²	0,207	-0,087 ²	0,343
Натријум (mmol/l)	0,109 ²	0,238	-0,003 ²	0,974	0,071 ²	0,440	-0,019 ²	0,836
Калцијум (mmol/l)	0,156 ²	0,090	-0,044 ²	0,632	0,098 ²	0,287	-0,102 ²	0,268
Магнезијум (mmol/l)	-0,121 ²	0,188	0,159 ²	0,082	-0,115 ²	0,210	0,063 ²	0,498

FSH - фоликулостимулирајући хормон; AST - аспартат аминотрансфераза; ALT - аланин аминотрансфераза; ALP - алкална фосфатаза; LDH - лактат дехидрогеназа; IL-6 - интерлеукин 6; r - Пирсонов коефицијент корелације; rho - Спирманов коефицијент корелације; p - статистичка значајност; ¹Пирсонов коефицијент корелације; ²Спирманов коефицијент корелације; Статистички значајне корелације су затамњене.

4.2.4. Корелација састава фоликуларне течности и квалитет ембриона и исход процеса вантелесне оплодње

У табели 29. приказана је корелација одређиваних параметара у фоликуларној течности и квалитет ембриона (број ембриона, број ембриона I класе и проценат ембриона I класе) и исход процеса вантелесне оплодње.

Статистички значајна корелација је утврђена између следећих параметара: вредности *FSH* у фоликуларној течности и броја ембриона (негативан смер; веза средње јачине), вредности *FSH* у фоликуларној течности и броја ембриона I класе (негативан

смер; веза средње јачине), вредности тестостерона у фоликуларној течности и броја ембриона (позитиван смер корелације; веза мале јачине), вредности тестостерона у фоликуларној течности и броја ембриона I класе (позитиван смер корелације; веза мале јачине), вредности *IL-6* у фоликуларној течности и броја ембриона (позитиван смер корелације; веза средње јачине), вредности *IL-6* у фоликуларној течности и броја ембриона I класе (позитиван смер корелације; веза средње јачине), вредности калцијума у фоликуларној течности и броја ембриона (позитиван смер корелације; веза мале јачине), вредности калцијума у фоликуларној течности и броја ембриона I класе (позитиван смер корелације; веза мале јачине) и вредности *ALT* у фоликуларној течности и броја ембриона (негативан смер корелације; веза мале јачине).

Што се тиче исхода, потврђена је статистички значајна корелација између вредности *FSH* у фоликуларној течности (негативан смер корелације; веза мале јачине) и позитивног исхода процеса вантелесне оплодње, вредности *IL-6* у фоликуларној течности (позитиван смер корелације; веза средње јачине) и вредности *ALT* у фоликуларној течности (негативан смер корелације; веза мале јачине).

Позитиван смер нам говори да више вредности прате више вредности и обрнуто, док нам негативан смер корелације говори да више вредности прате ниже вредности и обрнуто.

Табела 29. Корелација одређиваних параметара фоликуларне течности и квалитет ембриона и исход процеса вантелесне оплодње

	Број ембриона		I класа ембриона		% I класе ембриона		Позитиван исход	
	r/rho	p	r/rho	p	r/rho	p	r/rho	p
Естрадиол (pg/ml)	-0,062 ¹	0,499	-0,018 ¹	0,842	0,131 ²	0,155	-0,091 ²	0,321
Прогестерон (ng/ml)	-0,066 ¹	0,476	-0,021 ¹	0,818	0,120 ¹	0,190	-0,030 ²	0,748
FSH (mIU/ml)	-0,476²	0,000	-0,391²	0,000	0,116 ²	0,205	-0,191²	0,037
Тестостерон (ng/ml)	0,226²	0,013	0,216²	0,018	0,015 ²	0,869	-0,006 ²	0,952
AST (IU/l)	-0,001 ²	0,995	0,012 ²	0,893	-0,025 ²	0,788	-0,054 ²	0,558
ALT (IU/l)	-0,276²	0,002	0,171 ²	0,062	0,121 ²	0,188	-0,268²	0,003
ALP (U/l)	-0,064 ²	0,490	-0,071 ²	0,438	0,047 ²	0,614	-0,037 ²	0,691
LDH (U/l)	0,034 ²	0,712	0,018 ²	0,845	-0,054 ²	0,558	-0,097 ²	0,290
IL-6 (ng/ml)	0,485²	0,000	0,399²	0,000	-0,005 ²	0,953	0,670²	0,000
Гвожђе (umol/l)	-0,141 ¹	0,125	-0,162 ²	0,077	-0,042 ²	0,650	-0,071 ²	0,443
Калијум (mmol/l)	0,177 ¹	0,052	0,158 ²	0,085	0,052 ²	0,574	-0,061 ²	0,508
Натријум (mmol/l)	0,148 ¹	0,106	0,173 ²	0,058	0,156 ²	0,090	-0,120 ²	0,190
Калцијум (mmol/l)	0,183¹	0,046	0,200²	0,028	0,099 ²	0,280	-0,070 ²	0,446
Магнезијум (mmol/l)	-0,071 ¹	0,439	-0,068 ²	0,459	0,082 ²	0,372	-0,079 ²	0,390

FSH - фоликулостимулирајући хормон; AST - аспартат аминотрансфераза; ALT - аланин аминотрансфераза; ALP - алкална фосфатаза; LDH - лактат дехидрогеназа; IL-6 - интерлеукин 6; МП-зреле јајне ћелије у метафази II; r - Пирсонов коефицијент корелације; rho - Спирманов коефицијент корелације; p - статистичка значајност; ¹Пирсонов коефицијент корелације; ²Спирманов коефицијент корелације; Статистички значајне корелације су затамњене.

4.3. Састав фоликуларне течности као предиктивни маркер исхода процеса вантелесне оплодње

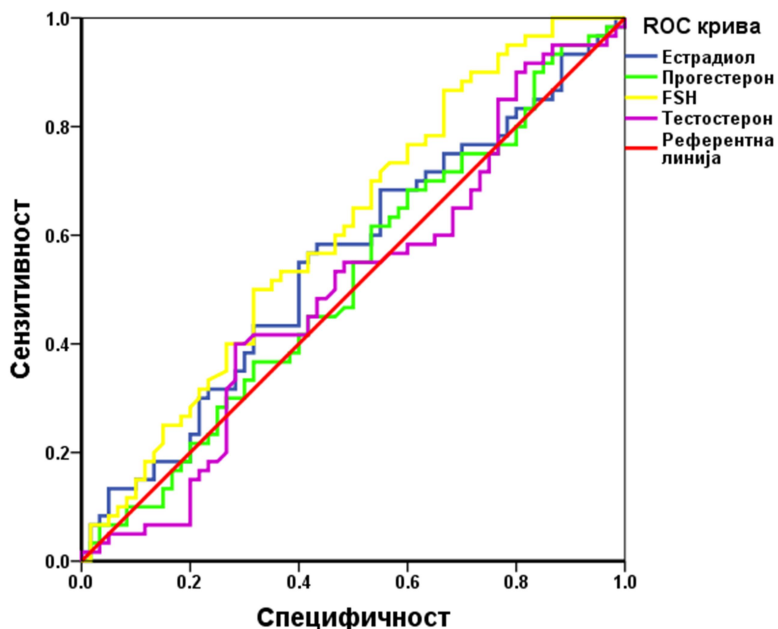
Резултати ROC анализе, коју смо користили како бисмо утврдили који од параметра из фоликуларне течности може да служи као предиктивни маркер за исход процеса вантелесне оплодње дати су у Табели 30. Графикони 16, 17, 18 и 19 представљају графички приказ ROC анализе.

Све површине су мало удаљене од 0,5. Једино су површине за *FSH*, *ALT* и *IL-6* веће од 0,5, такође су и високо статистички значајне ($p < 0,05$). Вредности *FSH*, *ALT* и *IL-6* у фоликуларној течности су могући предиктори исхода.

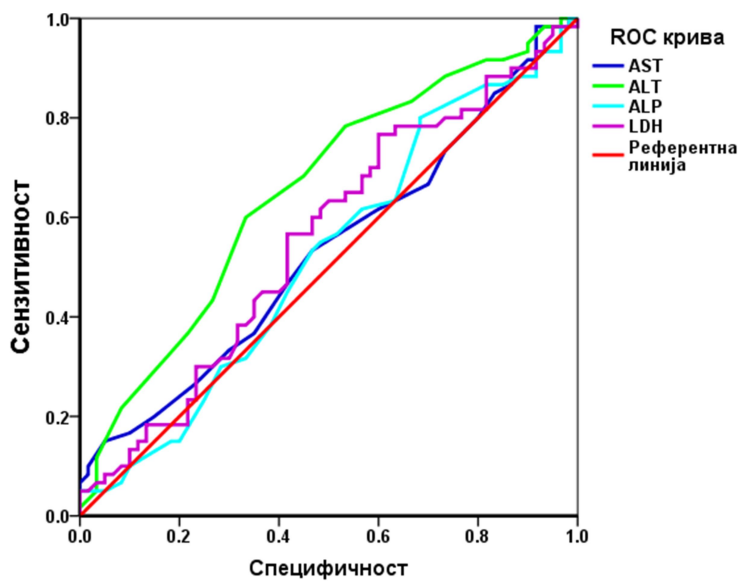
Табела 30. *ROC* анализа (параметри фоликуларне течности као предиктори исхода процеса вантелесне оплодње)

	Површина	* <i>p</i>	95% интервал поверења	
			Доња граница	Горња граница
Естрадиол (pg/ml)	0,553	0,319	0,449	0,656
Прогестерон (ng/ml)	0,517	0,747	0,413	0,621
FSH (mIU/ml)	0,610	0,037	0,509	0,711
Тестостерон (ng/ml)	0,503	0,952	0,398	0,608
AST (IU/l)	0,531	0,557	0,427	0,635
ALT (IU/l)	0,654	0,004	0,556	0,752
ALP (U/l)	0,521	0,690	0,417	0,625
LDH (U/l)	0,556	0,288	0,453	0,660
IL-6 (ng/ml)	0,887	0,000	0,819	0,955
Гвожђе (umol/l)	0,541	0,440	0,435	0,646
Калијум (mmol/l)	0,535	0,507	0,431	0,639
Натријум (mmol/l)	0,569	0,189	0,467	0,672
Калцијум (mmol/l)	0,541	0,443	0,437	0,644
Магнезијум (mmol/l)	0,546	0,338	0,441	0,650

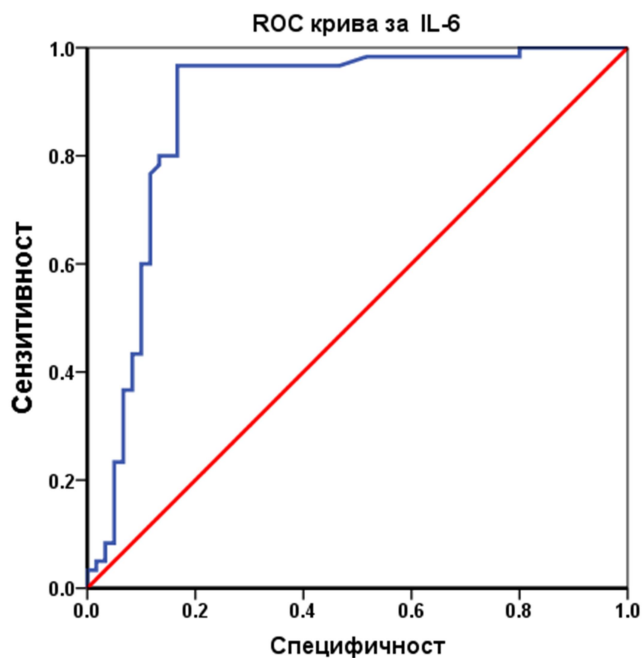
FSH - фоликулостимулирајући хормон; AST - аспартат аминотрансфераза; ALT - аланин аминотрансфераза; ALP - алкална фосфатаза; LDH - лактат дехидрогеназа; IL-6 - интерлеукин 6; *p* - статистичка значајност; Статистички значајне корелације су затамњене.



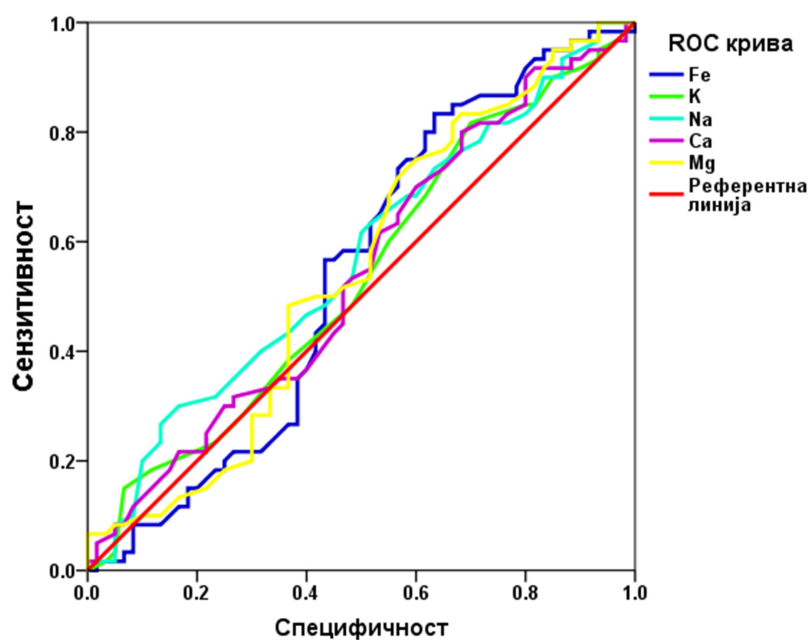
Графикон 16. ROC анализа за вредности хормона у фоликуларној течности као потенцијални маркер позитивног исхода процеса вантелесне оплодње



Графикон 17. ROC анализа за вредности ензима у фоликуларној течности као потенцијални маркер позитивног исхода процеса вантелесне оплодње



Графикон 18. ROC анализа за вредност IL-6 у фоликуларној течности као потенцијални маркер позитивног исхода процеса вантелесне оплодње



Графикон 19. ROC анализа за вредности биоелемената у фоликуларној течности као потенцијални маркер позитивног исхода процеса вантелесне оплодње

VI ДИСКУСИЈА

Главни циљ овог рада је био да се пронађу нови параметри који се могу на једноставан начин анализирати из фоликуларне течности на основу којих се може предвидети исход вантелесне оплодње и евентуално унапредити терапија током процеса вантелесне оплодње. Различите компоненте фоликуларне течности могу потенцијално да се користе као параметри за предвиђање исхода процеса вантелесне оплодње као и квалитета јајних ћелија које ће се оплодити и дати добар ембрион и трудноћу (113).

Како жена стари, плодност се значајно смањује, што потврђује Ние и сар.. Отприлике 10% жена не може природно остварити трудноћу до 34 године, док 87% не може природно остварити трудноћу од 40 до 45 године. Иако вантелесна оплодња донекле може превазићи пад плодности код старијих жена, стопе успешности вантелесне оплодње такође су знатно ниже међу старијим женама (114). Старост пацијенткиња је један од најважнијих фактора повезаних са успехом вантелесне оплодње. Заправо квалитет јајних ћелија је директно повезан са годинама живота пацијенткиња и што су жене старије квалитет јајних ћелија је лошији а самим тим мања је и вероватноћа да настану високо квалитетни ембриони способни да дају здраву трудноћу (115). Просечна старост пацијенткиња у нашој студији у односу на узорак од 120 пацијенткиња је била 36,74 година. Пацијенткиње су се по годинама старости статистички разликовале у односу на исход процеса вантелесне оплодње. У групи са позитивним исходом биле су млађе пацијенткиње. Просечна старост пацијенткиња са позитивним исходом је била $35,28 \pm 3,99$, док је просечна старост пацијенткиња са негативним исходом $38,2 \pm 5,01$.

Неколико студија потврђује да је ризик од инфертилитета три пута већи у популацији гојазних жена него код нормално ухрањених жена (116). Прекомерна телесна тежина утиче на овулацију сазревање јајних ћелија, развој ендометријума, имплантацију и побачај (117). Успостављање нормалне телесне тежине побољшава не само здравље жене, него и стопу позитивне трудноће (117, 118). Просечна вредност индекса телесне масе у нашој студији је била врло слична у групама пацијенткиња подељених према годинама старости и према исходу процеса вантелесне оплодње. Вредност индекса телесне масе је био унутар нормалних вредности ($<30 \text{ kg/m}^2$), што је био један од кључних критеријума за укључење у студију.

Вредност хормона *AMH* у серуму је важна јер указује на резерву јајника и нормална вредност (1-4 ng/ml) показује да јајник још увек садржи довољан број јајних ћелија потребних за оплодњу. Вредност *AMH* у серуму је добар предиктор за одговор јајника у процесу вантелесне оплодње (119). На основу резултата добијених у нашој студији просечна вредност *AMH* у серуму по пацијенткињи била је виша код пацијенткиња које имају 35 година и мање и статистички се значајно разликује у односу на пацијенткиње које су старије од 35 година и имају нижу вредност *AMH* у серуму. Разлика у вредности *AMH* у серуму код пацијенткиња са негативним и позитивним исходом вантелесне оплодње је статистички значајна са малим стандардним девијацијама. Више вредности су забележене код пацијенткиња са позитивним исходом. Концентрација *AMH* у серуму може да нам указује и на број фоликула, а самим тим и на број јајних ћелија, као и на вредност *FSH* како у серуму тако и у фоликуларној течности.

Контролисана стимулација јајника је први и кључни део процеса вантелесне оплодње у току кога долази до развоја већег или мањег броја фоликула, што зависи и од низа других фактора (број антралних фоликула, вредност *AMH* у серуму, година

старости) (120). Одговор на стимулацију јајника варира од пацијента до пацијента. Код неких пацијената може доћи или до прекомерног одговора јајника са ризиком од развоја синдрома хиперстимулације или до слабог одговора са лошом прогнозом (121). Већи број фоликула, а самим тим и већи број добијених јајних ћелија, повећавају проценат успешности процеса вантелесне оплодње. Од већег броја јајних ћелија може да се добије и већи број ембриона, који могу да се култивишу до стадијума бластоцисте и на тај начин се омогућава избор најквалитетнијих ембриона за трансфер (120).

Анализирајући карактеристике оваријалног одговора пацијенткиња које су учествовале у нашој студији (вредност естрадиола на дан завршне инјекције, број фоликула на дан завршне инјекције, број фоликула који су мањи и већи од 17 mm, број добијених јајних ћелија), сви параметри се статистички значајно разликују код пацијенткиња које су подељене у односу на године живота (≤ 35 и > 35 година) и на исход процеса вантелесне оплодње (негативан и позитиван). Све вредности које карактеришу оваријални одговор су више у групи којој припадају пацијенткиње које имају 35 и мање година и у групи којој припадају пацијенткиње са позитивним исходом процеса вантелесне оплодње, што се и очекивало и у складу је са ранијим истраживањима (121). Већина студија закључује да не постоји разлика у вредности серумског естрадиола на дан завршне инјекције између пацијенткиња које су трудне и оних које нису оствариле трудноћу (122, 123, 124, 125, 126, 127), међутим једна студија даје супротан закључак (128) што смо и ми закључили. Просечан број добијених јајних ћелија по пацијенткињи у нашој студији је био 8,22, максималан број добијених јајних ћелија је био 30. На основу ранијих истраживања већина студија је дошла до закључка да је оптималан број добијених јајних ћелија између 8 и 18 (120, 129, 130, 131, 132, 133). Ерриг и сар. су показали да развојни потенцијал јајне ћелије није зависио од величине фоликула (134, 135). Међутим јајне ћелије узете из већих фоликула имају већу вероватноћу да буду зреле. Стопа оплодње и стопа формирања бластоцита је нижа за јајне ћелије добијене из фоликула мањих од 10 mm. Пракса је показала да су фоликули од 18 mm фаворизовани у вантелесној оплодњи, а ранија истраживања указују да је доња гранична величина фоликула 14 mm која указује на присуство зреле јајне ћелије (134, 136).

Важан прогностички фактор исхода процеса вантелесне оплодње је квалитет јајних ћелија, будући да нуклеарна и цитоплазматска зрелост јајних ћелија може бити директно повезана са стопом успешности (137). Висок развојни потенцијал квалитетне јајне ћелије је блиско повезан са догађајима који се дешавају пре формирања фоликула, као и током фоликулогенезе. Сазревање, развој и диференцијација соматских и јајних ћелија унутар фоликула зависе од регулације експресије гена и активности ензима, као и од фактора раста и хранљивих материја који су локално произведени или допремљени унутар фоликула (138). Биолошки процеси унутар фоликула се могу моделирати и анализирати ради идентификације молекула и сигналних путева који утичу на квалитет јајних ћелија, као и утицаја из околине (139, 140, 141, 142, 143, 144, 145).

Анализом квалитета добијених јајних ћелија пацијенткиња које су учествовале у нашој студији, број зрелих МII јајних ћелија и број незрелих GV јајних ћелија, статистички значајно се разликује између групе пацијенткиња које су подељене на основу година старости, као и на основу исхода процеса вантелесне оплодње. Број MI јајних ћелија и DG јајних ћелија се не разликује између ових група пацијенткиња. Већи број зрелих МII јајних ћелија по пацијенткињи и већи број незрелих GV јајних ћелија

по пацијенткињи добијен је код млађих пацијенткиња и код пацијенткиња са позитивним исходом процеса вантелесне оплодње.

При процени успеха фертилизације, број оплођених и неоплођених јајних ћелија се разликовао између пацијенткиња у односу на године старости пацијенткиња. Већи број оплођених јајних ћелија по пацијенткињи уочен је код млађих жена што се повезује и са бројем добијених квалитетних зрелих јајних ћелија. Такође статистички значајна разлика се уочава у броју оплођених и неоплођених јајних ћелија између пацијенткиња са негативним и позитивним исходом вантелесне оплодње. Већи број оплођених јајних ћелија по пацијенткињи уочава се у групи пацијенткиња са позитивним исходом.

Добијени резултати указују на то да је код млађих жена за разлику од старијих добијен већи број јајних ћелија из већег броја фоликула који су већи од 17mm, самим тим стопа фертилизације је већа као и број добијених ембриона и ембриона I класе. Све наведено указује да млађе пацијенткиње имају већу концентрацију *AMH* у серуму као и концентрацију естрадиола у серуму на дан завршне инјекције, што је потврђено овом студијом. Групи са позитивним исходом управо због свега овога у већем броју припадају млађе пацијенткиње. Зато је и циљ вантелесне оплодње да се добије што већи број квалитетних јајних ћелија како би потенцијално настао већи број квалитетних ембриона који би се успешно имплантирали. Нажалост код старијих пацијенткиња оваријална резерва је истрошена па је готово немогуће добити већи број јајних ћелија.

Интрацитоплазматска инјекција сперматозоида је једна од најчешће коришћених техника потпомогнуте оплодње за лечење неплодности код парова са изостанком зачећа (146). У односу на примењени начин оплодње, односно да ли је примењен конвенционални *IVF* или *ICSI* или комбинација обе методе у нашој студији утврдили смо да се најчешће користила *ICSI* метода и када су у питању млађе пацијенткиње и када су у питању старије пацијенткиње. Такође *ICSI* метода је најчешће примењивана и код пацијенткиња са негативним и позитивним исходом процеса вантелесне оплодње. Разлика у заступљености метода оплодње по групама није била статистички значајна. Нека ранија истраживања такође су дошла до овог закључка да нема разлике између *IVF*-а и *ICSI*-а у погледу фертилизације и исхода процеса вантелесне оплодње (147, 148, 149). *Spreug* и ср., указују на то да се ембриони до фазе бластоцисте брже развијају ако су настали оплодњом јајних ћелија методом конвенционалног *IVF*-а од ембриона насталих оплодњом јајних ћелија методом *ICSI*. Ове тврдње су засноване на већем броју упоређених бластоциста на дан када су биле први пут оцењиване. Сматра се да је ово повезано са чињеницом да је ембрион престао да се ослања на транскрипте мајке и потпуно га контролише сопствени геном што се дешава у време између четвороћелијског и осмоћелијског ембрионалног развоја (150, 151, 152). *ICSI* поступак је првобитно развијен за лечење тежих облика мушке неплодности, али се сада користи у лечењу субфертилне популације пацијената, па чак и у случајевима када нема потребе за ову инвазивну процедуру (153). Најновији извештај Европског конзорцијума за праћење вантелесне оплодње је показао да је *ICSI* метода коришћена у 71,3% третмана, што је нешто више него годину дана раније (154). Разлог ове превелике употребе је у чињеници да је *ICSI* постао прихватљив метод за лечење женске неплодности у случајевима где су јајне ћелије лошег квалитета или се добије мали број, као и код старијих жена због честог изостанка механизма закључавања ћелије након уласка првог сперматозоида у саму ћелију (155).

У вантелесној оплодњи за успешну имплантацију и позитиван исход најбитније је да се добију ембриони доброг квалитета (156, 157, 158). Већи број добијених јајних

ћелија даје већу шансу за развој квалитетних ембриона (158, 159, 160, 161). Међутим корелација између " абнормалних " јајних ћелија, стопе оплодње и развој ембриона још увек није јасан (137). Након оплодње добијених јајних ћелија број насталих ембриона се статистички значајно разликовао између две групе пацијенткиња по годинама живота и по исходу процеса вантелесне оплодње. Већи број ембриона по пацијенткињи добијен је код пацијенткиња које имају 35 година и мање и са позитивним исходом, што је у складу са бројем добијених јајних ћелија. Број прве и друге класе ембриона по пацијенткињи је такође заступљенији код млађих пацијенткиња и код пацијенткиња са позитивним исходом и статистички се значајно разликовао у овим студијским групама.

Када је у питању дан ембриотрансфера најчешће смо радили ембриотрансфер трећег дана од дана аспирације јајних ћелија. До петог дана смо култивисали ембрионе пацијенткиња код којих је добијен већи број ембриона прве класе трећег дана, како бисмо видели који од њих ће се развити до стадијума бластоцисте и како бисмо за ембриотрансфер одабрали најквалитетније ембрионе са великим потенцијалом даљег развоја. Није постојала статистички значајна разлика у примени методе и исхода процеса вантелесне оплодње. Нека ранија истраживања се не поклапају са нашим резултатима где је потврђено да је трансфер бластоцисте обично успешнији од трансфера ембриона у ранијим стадијумима, јер у већем проценту долази до успешније имплантације бластоцисте и до позитивног исхода процеса вантелесне оплодње (150).

Исход процеса вантелесне оплодње зависи од многих фактора. Различите карактеристике пацијената (године живота пацијенткиња, вредност *AMH* у серуму, *BMI*, број фоликула у јајницима, протокол стимулације јајника, дебљина ендометријума, селекција сперматозоида, број квалитетних јајних ћелија) могу бити један од пресудних фактора за исход процеса вантелесне оплодње (162, 163, 164, 165, 166, 167), међутим и избор опреме за *IVF* лабораторију је јако важан фактор. Добра опрема омогућује да се обезбеде адекватни услови за културу ембриона као што је *pH* и температура унутар културе, концентрација O_2 у инкубаторима, температура унутар инкубатора, али је веома важан и потрошни материјал који се користи у току рада са гаметима и ембрионима, а предвиђен је за једнократну употребу (168, 169, 170, 171, 172, 173, 174). У међусобном садејству сви ови наведени фактори омогућавају да се добије што већи број фоликула који су $> 17mm$, што већи број зрелих квалитетних јајних ћелија, настанак високо квалитетних ембриона за ембриотрансфер, који су потом способни да дају нормалну трудноћу која резултује рођењем здравог детета. Анализирајући наше резултате успех вантелесне оплодње је 50% у нашим условима рада и по нашим принципима рада, што је изнад светског просека који износи 30%. Клинички дијагностикована трудноћа је заступљена са 42% у односу на укупно потврђених трудноћа хормоном β -*HCG*. Највећи проценат позитивног исхода је забележен код пацијенткиња које имају 35 година и мање. Разлика у исходу процеса вантелесне оплодње између две групе пацијенткиња по годинама старости је статистички значајна. Клиничка трудноћа је у 56% случајева потврђена код пацијенткиња које имају 35 година и мање, а 44% код пацијенткиња које имају више од 35 година. Биохемијска трудноћа је у већем броју случајева дијагностикована код пацијенткиња које су старије од 35 година (у 70% случајева).

Фоликуларна течност представља микросредину јајних ћелија која испуњава унутрашњост фоликула јајника. Унутар ових фоликула јајна ћелија постаје зрела под дејством сигналних путева који се међусобно укрштају што је од суштинског значаја за фертилизацију и развој квалитетног ембриона (146, 175). Фоликуларна течност је мешавина који садржи протеине, метаболите, полисахариде, стероиде, реактивне врсте кисеоника, факторе раста, антиоксидативне ензиме (176, 177) који делују као сигнални

молекули и доприносе правилном сазревању јајних ћелија. Молекуларне интеракције које регулишу развој фоликула и јајних ћелија до овулације, захтевају одговарајуће окружење које обезбеђује интеракције између фоликуларних ћелија и саме течности. Ћелије гранулозе су важне компоненте фоликула јајника које окружују јајне ћелије у развоју, од којих настају ћелије кумулуса и ћелије короне радиате. Ћелије гранулозе обезбеђују различите молекуле као што су сахариди, аминокиселине, сигнални молекули и нуклеотиде за ооците (178). Штавише, ове ћелије обезбеђују цистеин за синтезу глутатиона који је важан антиоксиданс за јајне ћелије (179, 180, 181) на тај начин ћелије гранулозе штите јајне ћелије од оксидативног стреса (182, 183) и регулишу сазревање јајних ћелија производњом регулаторних сигналних молекула изазивајући мејозу (184).

Квалитет јајних ћелија у многим студијама се наводи као најчешћи фактор (70-80%) који је одговоран за неуспех имплантације (185). Како на квалитет јајних ћелија може да утиче састав фоликуларне течности, од великог је значаја да се разуме природа молекуларних и ћелијских процеса унутар фоликула који могу утицати на квалитет и потенцијал јајних ћелија. Током процеса вантелесне оплодње квалитет јајних ћелија се процењује на основу морфолошких карактеристика. Предмет неколико студија је био да се на основу ћелија кумулуса процењује потенцијал јајних ћелија (186, 187), као и потенцијална улога ћелија гранулозе (188, 189, 190, 191, 192, 193, 194), као и да ли промене у метаболизму и саставу фоликуларне течности изазивају проблеме у сазревању јајних ћелија и њиховог потенцијала да се након оплодње развију у квалитетне ембрионе (195).

Различите компоненте фоликуларне течности у којој се налазе јајне ћелије могу да се користе као параметри за предвиђање квалитета јајне ћелије која ће се оплодити и дати потенцијално добар ембрион и трудноћу. Међу овим компонентима као важни параметри су управо стероидни хормони (113).

Средња вредност естрадиола у фоликуларној течности по пацијенткињи је износила $2342818,30 \pm 6114676,403$ pg/ml што је много више него у серуму. Ово може бити због великог броја слојева ћелија гранулоза у највећим фоликулима, што повећава лучење естрадиола (196, 197). Нека ранија истраживања су пријављивала много ниже вредности естрадиола у фоликуларној течности. Једна судија пријављује да је концентрација естрадиола у фоликуларној течности била 657425 ± 275979 pg/ml што је 10-50 пута веће него што је раније пријављено (198, 199). Анализирајући резултате наше студије добијено је да не постоји статистички значајна разлика између две групе пацијенткиња које су прво подељене на основу година живота (≤ 35 година и > 35 година), а затим према исходу процеса вантелесне оплодње (негативан и позитиван). Виша концентрација естрадиола у фоликуларној течности је забележена код пацијенткиња са 35 година и мање и са негативним исходом процеса вантелесне оплодње. Концентрација естрадиола у фоликуларној течности корелира само са концентрацијом *AMH* у серуму ($-0,264$; $0,004$) и то тако што веће концентрације естрадиола у фоликуларној течности прате ниже концентрације *AMH* у серуму. Студије које су раније рађене указују да је концентрација естрадиола у фоликуларној течности код пацијенткиња које су оствариле трудноћу знатно нижа од концентрације у фоликуларној течности пацијенткиња које нису оствариле трудноћу, што указује на то да висок ниво естрадиола има негативан утицај на исход трудноће, што потврђују и наши резултати (122, 45, 196, 100, 201, 202, 203, 204).

Прогестерон је доминантан стероидни хормон у преовулацијском фоликулу након скока *LH* (205, 206, 207), што доприноси нормалном раду јајника и може играти важну улогу у овулацији, развоју ембриона, имплантацији и одржавању трудноће (205,

208, 209, 210). Иако се сматра да прогестерон има утицај на сазревање јајних ћелија и развој ембриона (205, 206, 211, 212), механизам деловања прогестерона на јајне ћелије није у потпуности схваћен. Средња вредност прогестерона у фоликуларној течности по пацијенткињи у нашој студији је износила $40802,89 \pm 204761,63$ ng/ml. Резултати наше студије показују да не постоји статистички значајна разлика између две групе пацијенткиња које су прво подељене на основу година живота (≤ 35 година и >35 година), а затим према исходу процеса вантелесне оплодње (негативан и позитиван). Виша концентрација прогестерона у фоликуларној течности је забележена код пацијенткиња које имају више од 35 година и са негативним исходом процеса вантелесне оплодње. Концентрација прогестерона у фоликуларној течности корелира само са концентрацијом *AMH* у серуму (-0,211; 0,021), тако што веће концентрације прогестерона у фоликуларној течности прате ниже концентрације *AMH* у серуму. За разлику од наше студије резултати студије која је рађена 2010 показују позитивну корелацију између концентрације прогестерона из фоликуларне течности и исхода оплодње. Нивои прогестерона у фоликуларној течности били су знатно већи (за 30%) у случајевима нормалне фертилизације за разлику од неуспешне фертилизације, такође ниво прогестерона у фоликуларној течности био је значајно већи код пацијената код којих је исход процеса вантелесне оплодње био позитиван (205, 207)

Средња вредност *FSH* у фоликуларној течности по пацијенткињи је износила $4,72 \pm 3,12$ mIU/ml. Анализирајући добијене резултате можемо закључити да постоји статистички значајна разлика између две групе пацијенткиња које су прво подељене на основу година живота (≤ 35 година и >35), а затим према исходу процеса вантелесне оплодње (негативан и позитиван). Виша концентрација *FSH* у фоликуларној течности је забележена код пацијенткиња које имају више од 35 година и са негативним исходом процеса вантелесне оплодње. Са годинама пацијенткиња у серуму се смањује концентрација *AMH*, смањује се и број фоликула, али расте концентрација *FSH* како у серуму, тако и у фоликуларној течности (121). Веће концентрације *FSH* у фоликуларној течности прате старије пацијенткиње од 35 година и већа је стопа фертилизације. Такође високе концентрације *FSH* у фоликуларној течности прате ниже вредности *AMH* у серуму, а самим тим и мањи број фоликула, мањи број јајних ћелија, мањи број *MII* јајних ћелија и мањи проценат *MII* јајних ћелија. Што је мањи број укупно добијених јајних ћелија смањује се број оплођених јајних ћелија, број ембриона и број ембриона I класе. Ниже вредности *FSH* у фоликуларној течности могу се повезати са позитивним исходом процеса вантелесне оплодње. Високе концентрације *FSH* у фоликуларној течности (213), забележене у ранијој студији, указују да је већа могућност да се добију зреле јајне ћелије, као и већи број јајних ћелија, што се не потврђује у нашој студији, међутим раније студије указују да високе концентрације *FSH* у фоликуларној течности повећавају стопу фертилизације, што потврђује и наша студија (214). Високе концентрације *FSH* у фоликуларној течности повезују се са прокрвљеношћу самих фоликула, јер се *FSH* филтрира из крви у фоликуларну течност (215).

Средња вредност тестостерона у фоликуларној течности по пацијенткињи је износила $4,49 \pm 1,89$ ng/ml. Резултати наше студије показују да не постоји статистички значајна разлика између две групе пацијенткиња које су прво подељене на основу година живота (≤ 35 година и >35 година), а затим према исходу процеса вантелесне оплодње (негативан и позитиван). Разлика у концентрацији између млађих и старијих пацијенткиња, као и између пацијенткиња са негативним и позитивним исходом процеса вантелесне оплодње, је потпуно занемарљива. Већа концентрација тестостерона у фоликуларној течности прати мањи број јајних ћелија, мањи број *MII* јајних ћелија и мањи број оплођених јајних ћелија, али већи број ембриона укупно и

већи број ембриона I класе. Ранија студија нам указује да веће концентрације тестостерона у фоликуларној течности указује на артретичне промене у фоликулима (216), што се може довести у везу са нашим резултатима на основу којих се може видети да већа концентрација указује на мањи број добијених јајних ћелија. Друга студија показује да већа концентрација тестостерона у фоликуларној течности делује позитивно на фертилизацију јајних ћелија (217), што се не слаже са нашом студијом. Наши резултати на основу корелације показују да веће концентрације тестостерона могу утицати на фертилизацију тако што је број укупно оплођених јајних ћелија мањи што је већа концентрација тестостерона у фоликуларној течности.

Због неслагања у резултатима наше студије а и других студија (207, 216, 217, 218, 219, 220, 221) веза између концентрације естрадиола, прогестерона, *FSH* и тестостерона са исходом процеса вантелесне оплодње остаје нејасна.

У литератури не постоје новији доступни подаци у вези активности и концентрације ензима *AST*, *ALT* и *ALP* у хуманој фоликуларној течности и њихов утицај на исход процеса вантелесне оплодње. Постоји доста студија које су анализирале фоликуларну течност животиња (говеда, мишева, оваца, коза и камила) (222, 223, 224, 225). Једна студија рађена на хуманом материјалу закључила је да не постоји статистички значајна разлика у концентрацијама *AST* и *ALT* између фоликуларне течности која је добијена из фоликула са левог и десног јајника. Средња концентрација *AST* је била 28,5 IU/l, док је просечна концентрација *ALT* била 13,1 IU/l (204, 226).

Средња вредност *AST* у фоликуларној течности по пацијенткињи у нашој студији је износила $17,46 \pm 9,59$ IU/L. Резултати наше студије показују да не постоји статистички значајна разлика између две групе пацијенткиња које су прво подељене на основу година живота (≤ 35 година и > 35 година), а затим према исходу процеса вантелесне оплодње (негативан и позитиван). Виша концентрација *AST* у фоликуларној течности је забележена код пацијенткиња које имају 35 година и мање и код пацијенткиња са негативним исходом процеса вантелесне оплодње. Већа концентрација *AST* у фоликуларној течности прати већи број фоликула.

Средња вредност *ALT* у фоликуларној течности по пацијенткињи у нашој студији је износила $8,83 \pm 5,70$ IU/L. Резултати наше студије показују да не постоји статистички значајна разлика између две групе пацијенткиња које су подељене на основу година живота (≤ 35 година и > 35 година). Код пацијенткиња које су подељене према исходу процеса вантелесне оплодње (негативан и позитиван) постоји статистички значајна разлика у концентрацији *ALT* у фоликуларној течности. Забележена је виша концентрација *ALT* код пацијенткиња са негативним исходом процеса вантелесне оплодње. Виша концентрација *ALT* у фоликуларној течности повезује се са мањим бројем добијених јајних ћелија, мањим бројем МП јајних ћелија, а самим тим и мањим бројем оплођених јајних ћелија и мањим бројем ембриона.

Средња вредност *ALP* у фоликуларној течности по пацијенткињи у нашој студији је износила $19,05 \pm 11,07$ U/L. Резултати наше студије показују да не постоји статистички значајна разлика између две групе пацијенткиња које су прво подељене на основу година живота (≤ 35 година и > 35 година), а затим према исходу процеса вантелесне оплодње (негативан и позитиван). Виша концентрација је забележена код млађих пацијенткиња и код пацијенткиња са негативним исходом процеса вантелесне оплодње. Концентрација *ALP* у фоликуларној течности не корелира са параметрима које смо ми пратили. Активност алкалне фосфатазе у фоликуларној течности коза код здравих фоликула је била 0.268 ± 0.002 $\mu\text{mol/ml}$, код благо атретичних 0.260 ± 0.003 $\mu\text{mol/ml}$ и код атретичних 0.157 ± 0.002 $\mu\text{mol/ml}$, што указује на смањење активности

алкалне фосфатазе како фоликул напредује у стадијуму атрезije, што може да се повеже са нашим резултатима да су више концентрације *ALP* забележене у групи са негативним исходом (225).

LDH је метаболички ензим и ослобађа се у околин у због ћелијске смрти и може да служи за процену цитотоксичности (227). Међутим, нема много извештаја о процени нивоа *LDH* у хуманој фоликуларној течности, али се сматра да *LDH* може играти улогу у фоликулогенези. Примећено је да је већа количина *LDH* у фоликуларној течности у односу на серум, као и да ниво *LDH* расте са порастом фоликула, већа активност *LDH* у фоликулу може да указује на лош квалитет јајних ћелија и фрагментацију ембриона (227, 228). Такође ова студија није показала корелацију између активности *LDH* и зрелости јајних ћелија (све прикупљене јајне ћелије су оцењене као МII ћелије). Средња вредност *LDH* у фоликуларној течности по пацијенткињи које су учествовале у нашој студији је износила $246,59 \pm 105,68$ U/L. Резултати наше студије показују да не постоји статистички значајна разлика између две групе пацијенткиња које су прво подељене на основу година живота (≤ 35 година и > 35 година), а затим према исходу процеса вантелесне оплодње (негативан и позитиван). Виша концентрација је забележена код млађих пацијенткиња и код пацијенткиња са негативним исходом процеса вантелесне оплодње. Више вредности *LDH* у фоликуларној течности прате већи број фоликула и већи број јајних ћелија.

Средња вредност *IL-6* у фоликуларној течности по пацијенткињи у нашој студији је износила $6,59 \pm 6,29$ ng/ml. Резултати наше студије показују да постоји статистички значајна разлика између две групе пацијенткиња које су прво подељене на основу година живота (≤ 35 година и > 35 година), а затим према исходу процеса вантелесне оплодње (негативан и позитиван). Виша концентрација је забележена код млађих пацијенткиња и код пацијенткиња са позитивним исходом процеса вантелесне оплодње. Примећено је да су екстремно високе концентрације *IL-6* у фоликуларној течности довеле до спонтаног побачаја у раној трудноћи. Од 120 пацијенткиња које су биле укључене у студију 11 је имало спонтани побачај у раној трудноћи, чија је концентрација *IL-6* у фоликуларној течности прелазила 10 ng/ml. У нашој студији највећа концентрација *IL-6* у фоликуларној течности је била 44 ng/ml. Ранија истраживања дошала су до сличних закључака (229). То сугерише да су екстремно високе концентрације или недостатак *IL-6* повезани са неуспехом вантелесне оплодње или са губитком трудноће. У складу са претходним студијама (230, 231, 232, 233, 234), наша студија је потврдила да високи нивои *IL-6* у фоликуларној течности може значајно побољшати стопу клиничке трудноће, што неким другим студијама није потврђено (84, 230, 233, 235). Више вредности *IL-6* у фоликуларној течности прате млађе пацијенткиње, већу концентрацију естрадиола у серуму на дан завршне инјекције, а самим тим и већи број фоликула, већи број добијених јајних ћелија, већи број зрелих јајних ћелија, већи број оплођених јајних ћелија, већи број ембриона, као и ембриона I класе. Све ово указује на то да више вредности *IL-6* у фоликуларној течности позитивно утичу на исход процеса вантелесне оплодње што је и доказано овом студијом. Ово потврђује и група аутора (236), који су на основу својих резултата закључили да веће концентрације *IL-6* у фоликуларној течности корелирају са већим бројем зрелих јајних ћелија, већим бројем ембриона I класе и са позитивним исходом. Altun и сар. показују да веће концентрације *IL-6* у фоликуларној течности негативно утичу на исход вантелесне оплодње, такође њихови резултати показују да не постоји корелација између броја добијених јајних ћелија, као ни квалитета ембриона. Они сматрају да је за успешност исхода процеса вантелесне оплодње битнија рецептивност ендометријума као и штетно дејство високе концентрације *IL-6* у ендометријуму (85).

Ранија истраживања везана за биоелементе показују да постоји доследна скоро линеарна веза између величине фоликула, концентрације биоелемената у фоликуларној течности и концентрације биоелемената у крви, што указује на то да фоликуларна течност потиче од транскудата крви (92). Када су у питању биоелементи у нашој студији није забележена статистички значајна разлика у концентрацијама између две групе пацијенткиња које су прво подељене на основу година живота (≤ 35 година и > 35 година), а затим према исходу процеса вантелесне оплодње (негатива и позитива). Код старијих пацијенткиња забележена је виша концентрација гвожђа и магнезијума, док сви остали испитивани биоелементи (калијум, натријум, калцијум) у незнатно већој концентрацији се налазе у фоликуларној течности млађих жена. Сви биоелементи се у незнатно већој концентрацији у фоликуларној течности налазе код пацијенткиња са негативним исходом.

Концентрација гвожђа у фоликуларној течности једино корелира само са *BMI* (-0,182; 0,046), више вредности гвожђа прате ниже вредности *BMI*. Раније рађена студија потврђује што и наша да не постоји веза између концентрације гвожђа у фоликуларној течности и развоја ембриона (237).

Више вредности калијума у нашој студији прате већи број фоликула и јајних ћелија, док више вредности натријума у фоликуларној течности прати више вредности естрадиола на дан завршне инјекције и већи број фоликула, а самим тим и већи број јајних ћелија добијених из тих фоликула. У студији која је раније рађена однос Na и K није утицао на квалитет јајне ћелије, а самим тим и на исход процеса вантелесне оплодње (238).

Више вредности калцијума у нашој студији прате млађе пацијенткиње, већи број фоликула, већи број јајних ћелија добијених из тих фоликула, а самим тим и већи број ембриона насталих из већег броја добијених јајних ћелија и већи број ембриона I класе. Концентрација магнезијума у фоликуларној течности у нашој студији не корелира ни са једним праћеним параметром. Ниске концентрације калцијума и магнезијума забележене у студији која је раније рађена нису утицале на квалитет јајних ћелија. С друге стране, висока концентрација магнезијума и висок однос магнезијума и калцијума (2:1) побољшавају рани ембрионални развој, јер магнезијум регулише хомеостазу калцијума у зиготу (238). Ниске концентрације магнезијума и калцијума могу да инхибирају наставак мејозе, а инхибиторни ефекат ниске концентрације магнезијума је већи од ниске концентрације калцијума (238).

Ни једна ранија студија, као и наша не налази везу између концентрације праћених биоелемента у фоликуларној течности и исхода процеса вантелесне оплодње, а ни везу са квалитетом јајних ћелија.

Главни циљ ове студије је био да се испита могућност који од одређиваних параметара из фоликуларне течности би могао да се користи као предиктивни маркер исхода процеса вантелесне оплодње. Након примене *ROC* анализе, резултати добијени овом студијом показују да се као предиктивни маркер исхода процеса вантелесне оплодње могу користити *FSH*, *ALT* и *IL-6*. Нека ранија истраживања су такође ово потврдила.

Пошто фоликуларна течност представља микросредину за *in vivo* развој јајних ћелија и мора да садржи све компоненте које су неопходне за развој фоликула и правилно сазревање јајних ћелија (239) бројне студије су вршиле циљане анализе, али нису успели да идентификују клинички користан биомаркер због више ограничења која тренутно постоје, а њихово превазилажење је још увек у повоју (240). Прво, а можда и највеће ограничење је у случају да се трансфер одради са два ембриона. У случају да се

само један ембрион успешно имплантира, за сада не можемо знати који се ембрион имплантирао. У случају близаначке трудноће могуће је повезати састав фоликуларне течности са исходом вантелесне оплодње. Друго, процес стимулације јајника може изменити састав фоликуларне течности (241), па би све жене требале бити на истом режиму терапије што је за сада неизводљиво или да се практикује вантелесна оплодња из природног циклуса. Треће, постоји могућност контаминације фоликуларне течности медијумом за испирање фоликула који садржи бројне метаболите, попут глукозе, а неки центри користе ову методу приликом аспирације фоликуларне течности. Такође, фоликуларна течност из претходно аспирираног фоликула може да доведе до контаминације течности следећег фоликула (241).

Све ово нам указује да су потребна додатна истраживања како би се допринело успешном унапређењу вантелесне оплодње.

VII ЗАКЉУЧАК

На основу резултата истраживања докторске дисертације донели смо следеће закључке:

1. Пацијенткиње које имају 35 година и мање, имају бољу оваријалну резерву, већи број фоликул и бољи одговор на стимулацију јајника, а самим тим и већи број добијених јајних ћелија које су зреле и способне за оплодњу, већи број ембриона I класе и веће шансе са успехом.
2. За оплодњу јајних ћелија и код млађих и код старијих пацијенткиња, као и код оних са позитивним и негативним исходом вантелесне оплодње највише је примењивана *ICSI* метода.
3. У највећем броју случајева ембриотрансфер је рађен трећег дана од дана аспирације јајних ћелија.
4. Резултати потврђују висок проценат успешности вантелесне оплодње (50%), као и висок проценат клинички доказаних трудноћа (42%).
5. Концентрација естрадиола, прогестерона и тестостерона у фоликуларној течности није у корелацији са квалитетом јајних ћелија, као ни са исходом вантелесне оплодње.
6. Концентрација *FSH* је у корелацији са квалитетом јајних ћелија и исходом процеса вантелесне оплодње. Више концентрације су забележене у фоликуларној течности старијих пацијенткиња и пацијенткиња са негативним исходом.
7. Концентрација ензима *AST*, *ALP* и *LDH* у фоликуларној течности није у корелацији са квалитетом јајних ћелија, као ни са исходом вантелесне оплодње.
8. Концентрација *ALT* у фоликуларној течности је у корелацији са квалитетом јајних ћелија и исходом процеса вантелесне оплодње. Више концентрације су забележене у фоликуларној течности старијих пацијенткиња и пацијенткиња са негативним исходом.
9. Концентрација *IL-6* у фоликуларној течности је у корелацији са квалитетом јајних ћелија и исходом процеса вантелесне оплодње и виша је у у фоликуларној течности код млађих пацијенткиња и пацијенткиња са позитивним исходом.
10. Концентрација биоелемената у фоликуларној течности није повезана са квалитетом јајних ћелија, као ни са исходом вантелесне оплодње
11. Резултати *ROC* анализе указују да се као предиктивни маркери исхода вантелесне оплодње могу користити концентрације *FSH*, *ALT* и *IL-6* у фоликуларној течности.

Резултати представљају добру основу за даље детаљније испитивање молекуларних механизма деловања састава фоликуларне течности на квалитет јајних ћелија и на сам исход вантелесне оплодње. Потребан је много већи број узорака фоликуларне течности како би се са сигурношћу могло рећи који параметар и у којој мери утиче на квалитет јајних ћелија, самим тим и на стопу оплодње и исход вантелесне оплодње. Такође, треба радити и на развоју начина узорковања фоликуларне течности како би се избегла могућа контаминација фоликуларне течности.

VIII ЛИТЕРАТУРА

1. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978, 2: 366.
2. Thompson C. IVF global histories, USA: between Rock and a *marketplace*. *Reproductive Biomedicine & Society Online*. 2016, 2:128-35.
3. Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Kupka MS, De Mouzon J, Erb K, Mocanu E, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2012: Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*. 2016, 31(8):1638-52.
4. Yatsenko, S. A. and Rajkovic, A. Genetics of human female infertility. *Biology of Reproduction*. 2019, 101(3), 549–66.
5. 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.
6. Izzo CR, Monteleone PA, Serafini PC. Human reproduction: current status. *Revista da Associacao Medica Brasileira*. 2015, 61: 557-9.
7. Makar RS, Toth TL. The evaluation of infertility. *American journal of clinical pathology*. 2002, 117:95-103.
8. Silvestris, E., Lovero, D., Palmirotta, R. Nutrition and Female Fertility: An Interdependent Correlation. *Frontiers in Endocrinology*. 2019, 10:346.
9. Obuna, J. A., Ndukwe, E. O., Ugboma, H. A. A., Ejikeme, B. N., & Ugboma, E. W. Clinical presentation of infertility in an outpatient clinic of a resource poor setting, South East Nigeria. *International Journal of tropical disease & Health*. 2012, 2(2):123-31.
10. Van Voorhis B. J.. Clinical practice In vitro fertilization. *The New England journal of medicine*. 2007, 356:379-86.
11. Bavister BD. Early history of In-vitro fertilization. *Journ of the Society for Reproduction and Fertility*. 2002, 124:181-96.
12. Bernadett Nagy, Laszlo Poto Nelli Farkas, Miklos Koppan, Akos Varnagy, Kalman Kovacs, Szilard Papp, Noemi Bohonyi, Jozsef Bodis. Follicular fluid progesterone concentration is associated with fertilization outcome after IVF: a systematic review and meta-analysis, *Reproductive BioMedicine Online*. 2019, 38(6):871-82.
13. Abdullah Karaer, Gorkem Tuncay, Akın Mumcu & Berat Dogan. Metabolomics analysis of follicular fluid in women with ovarian endometriosis undergoing in vitro fertilization. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2019, 65(1):39-47.
14. Kirsty A Walters, Stephanie Eid, Melissa C Edwards, Rachel Thuis-Watson, Reena Desai, Mark Bowman, Anthony J Marren, David J Handelsman. Steroid profiles by liquid chromatography-mass spectrometry of matched serum and single dominant ovarian follicular fluid from women undergoing IVF. *Reproductive BioMedicine Online* . 2019, 38(1):30-7.
15. Laís Basuino and Carolina F. Silveira. Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assisted Reproduction*. 2016, 20(1):38-40.
16. Bindu N Mehta, Meena N Chimote, Nishad N Chimote, Nirmalendu M Nath and Natachandra M Chimote. Follicular-fluid anti-Mullerian hormone (FF AMH) is a plausible biochemical indicator of functional viability of oocyte in conventional in vitro fertilization (IVF) cycles. *Journal of human reproductive sciences*. 2013, 6 (2): 99–105.

17. Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Journal Human Reproduction*. 2010, 25:2944-54.
18. Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J. The oocyte. *Human Reproduction*. 2012, 27:2-21.
19. Virant-Klun, I. Postnatal oogenesis in humans: a review of recent findings. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*. 2015, 8:49–60.
20. Guyton A, Hall J. *Medicinska fiziologija*. 11. izdanje. Beograd: Savremena administracija. 2008.
21. Swain, J. E., & Pool, T. B. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Human reproduction update*. 2008, 14(5):431-46.
22. Messinis I. E. From menarche to regular menstruation: endocrinological background. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006, 1092:49-56.
23. Swain, J. E., & Smith, G. D. Reversible phosphorylation and regulation of mammalian oocyte meiotic chromatin remodeling and segregation. *Society of Reproduction and Fertility supplement*. 2007, 63:343-58.
24. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Oogenesis. Доступно на: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10008/>
25. Rimón-Dahari, N., Yerushalmi-Heinemann, L., Alyagor, L., & Dekel, N. Ovarian Folliculogenesis. *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*. 2016, 167-90.
26. Devesa, J., & Caicedo, D. The Role of Growth Hormone on Ovarian Functioning and Ovarian Angiogenesis. *Frontiers in Endocrinology*. 2019, 10:450.
27. Gershon, E., & Dekel, N. (2020). Newly Identified Regulators of Ovarian Folliculogenesis and Ovulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(12):4565.
28. Larose, H., Shami, A. N., Abbott, H., Manske, G., Lei, L., & Hammoud, S. S. Gametogenesis: A journey from inception to conception. *Current topics in developmental biology*. 2019, 132:257-310.
29. Lin, L., Yang, R., Yin, C., & Kee, K. Studying human reproductive biology through single-cell analysis and in vitro differentiation of stem cells into germ cell-like cells. *Human Reproduction Update*. 2020, 1-19.
30. Findlay, J. K., Hutt, K. J., Hickey, M., & Anderson, R. A. How Is the Number of Primordial Follicles in the Ovarian Reserve Established?. *Biology of reproduction*. 2015, 93(5):111.
31. Heiligentag, M., & Eichenlaub-Ritter, U. Preantral follicle culture and oocyte quality. *Reproduction, Fertility and Development*. 2018, 30(1):8-43.
32. Fortune JA, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. “The primordial to primary follicle transition.” *Molecular and cellular endocrinology*. 2000, 163:53-60.
33. Chen, D., Sun, N., Hou, L., Kim, R., Faith, J., Aslanyan, M., Tao, Y., Zheng, Y., Fu, J., Liu, W., Kellis, M., & Clark, A. Human Primordial Germ Cells Are Specified from Lineage-Primed Progenitors. *Cell reports*. 2019, 29(13), 4568-82.

34. Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and sterility*. 2015, 103: 303-16.
35. Sánchez, F., & Smitz, J. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Basis of Disease*. 2012, 1822(12), 1896-1912.
36. Dewailly, D., Robin, G., Peigne, M., Decanter, C., Pigny, P., & Catteau-Jonard, S. Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Human Reproduction Update*. 2016, 22(6), 709–24.
37. Abbara, A., Clarke, S. A., & Dhillon, W. S. Novel Concepts for Inducing Final Oocyte Maturation in In Vitro Fertilization Treatment. *Endocrine Reviews*. 2018, 39(5), 593-628.
38. Hunt, P. A., & Hassold, T. J. Human female meiosis: what makes a good egg go bad?. *Trends in Genetics*. 2018, 24(2), 86-93.
39. Porras-Gómez, T. J., & Moreno-Mendoza, N. Neo-oogenesis in mammals. *Zygote (Cambridge, England)*. 2017, 25(04), 404-422.
40. Coticchio, G., Dal Canto, M., Mignini Renzini, M., Guglielmo, M. C., Brambillasca, F., Turchi, D., Paola Vittoria, N., Fadini, R. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproduction Update*. 2015, 21(4), 427-54.
41. Arroyo, A., Kim, B., & Yeh, J. Luteinizing Hormone Action in Human Oocyte Maturation and Quality: Signaling Pathways, Regulation, and Clinical Impact. *Reproductive Sciences*. 2020, 27:1223-52.
42. Sen, A. and Caiazza, F. Oocyte Maturation A story of arrest and release. *Frontiers in Bioscience*. 2013, S5(2), 451-77.
43. Smith G. D. In vitro maturation of oocytes. *Current women's health reports*. 2001, 1(2):143-51.
44. Salehnia M, Zavareh S. The effects of progesterone on oocyte maturation and embryo development *International journal of fertility & sterility*. 2013; 7(2): 74-81.
45. Carpintero NL, Suárez OA, Mangas CC, Varea CG, Rioja RG. Follicular steroid hormones as markers of oocyte quality and oocyte development potential. *Journal Human Reproduction Scienci*. 2014, 7(3):187-93.
46. Jabbour, H. N., Kelly, R. W., Fraser, H. M., & Critchley, H. O. D. Endocrine Regulation of Menstruation. *Endocrine Reviews*. 2006, 27(1), 17-46.
47. Messinis, I. E., Messini, C. I., & Dafopoulos, K. Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014, 28(6), 714-22.
48. Mesen, T. B., & Young, S. L. Progesterone and the Luteal Phase. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2015, 42(1), 135-151.
49. Laura Rienzi, Basak Balaban, Thomas Ebner and Jacqueline Mandelbaum. The oocyte. *Human Reproduction*. 2012, 27:2-21.
50. Kaufman, O. H., & Marlow, F. L. Methods to study maternal regulation of germ cell specification in zebrafish. *Methods in cell biology*. 2016, 134:1–32.

51. Tong, Z. B., Gold, L., Pfeifer, K. E., Dorward, H., Lee, E., Bondy, C. A., Dean, J., & Nelson, L. M. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nature genetic*. 2000, 26(3), 267–8.
52. Liu M. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology* . 2011, 9:149.
53. Litscher, E. S., & Wassarman, P. M. Zona Pellucida Proteins, Fibrils, and Matrix. *Annual Review of Biochemistry*. 2020, 89(1), 695–715.
54. Talbot, P., & Dandekar, P. Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals?. *Microscopy research and technique*. 2003, 61(4):349–57.
55. Loredana Papale, Agnese Fiorentino, Markus Montag, and Giovanna Tomasi. The zygote. *Human Reproduction*. 2012, 27:22-49.
56. Hennet, M. L., Combelles, C. M. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *The International journal of developmental biology*. 2012, 56(10-12):819–31.
57. Rodgers, R. J., Irving-Rodgers, H. F. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of reproduction*, 2010, 82(6):1021-29.
58. Wilding, M., Singer, M., Fehr, P., Haeberlin, F., Roth, F., Lachat, R., Di Matteo, L., Capobianco, C., & Dale, B. The effect of extended culture of cumulus-oocyte complexes in follicular fluid during in vitro fertilisation cycles. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2006, 23(3):129-36.
59. Resende LOT, Reis RM, Ferriani RA, Vireque AA, Santana LF, de Sá Rosa e Silva AC, Martins Wde P. Concentration of steroid hormones in the follicular fluid of mature and immature ovarian follicles of patients with polycystic ovary syndrome submitted to in vitro fertilization. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2010; 32:447-53.
60. Shaaker M, Rahimipour A, Nouri M, Khanaki K, Darabi M, Farzadi L, Shahnazi V, Mehdizadeh A. Fatty acid composition of human follicular fluid phospholipids and fertilization rate in assisted reproductive techniques. *Iranian Biomedical Journal* . 2012, 3:162-8.
61. Warzych E, Lipinska P. Energy metabolism of follicular environment during oocyte growth and maturation. *Journal of Reproduction and Development*. 2020, 14:66(1):1-7.
62. M. G. Da Broi, V. S. I. Giorgi, F. Wang, D. L. Keefe, D. Albertini and P. A. Navarro. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2018, 35:735-51.
63. S. Iliodromiti, T. W. Kelsey, O. Wu, R. A. Anderson, and S. M. Nelson, The predictive accuracy of anti-Müllerian hormone for live birth after assisted conception: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Human Reproduction Update*. 2014, 20(4):560-70.
64. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, et al. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2007, 92:1796-802.
65. Alon Kedem-Dickman, Ettie Maman, Yuval Yung, Gil M Yerushalmi, Rina Hemi, Mirit Hanochi, Jehoshua Dor, Ariel Hourvitz. Anti-Müllerian hormone is highly expressed and

- secreted from cumulus granulosa cells of stimulated preovulatory immature and atretic oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*. 2012, 24:540-6.
66. Davis C, Milner J. Nutrigenomics, vitamin D and cancer prevention. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*. 2011, 4(1):1-11.
 67. Pagliardini L, Vigano P, Molgoro M, Persico P, Salonia A, Vailati SH, et al. High prevalence of vitamin D deficiency in infertile women referring for assisted reproduction. *Nutrients*. 2015, 7(12):9972-84.
 68. Shahbazi M, Jeddi-Tehrani M, Zareie M, Salek-Moghaddam A, Akhondi M, Bahmanpoor M, et al. Expression profiling of vitamin D receptor in placenta, decidua and ovary of pregnant mice. *Placenta*. 2011, 32: 657-64.
 69. Parikh G, Varadinova M, Suwandhi P, Araki T, Rosenwaks Z, Poretsky L, et al. Vitamin D regulates steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) production in human ovarian cells. *Hormone and Metabolic Research*. 2010, 42: 754.
 70. Merhi Z, Doswell A, Krebs K, Cipolla M. Vitamin D alters genes involved in follicular development and steroidogenesis in human cumulus granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014, 99:1137-45.
 71. Surajeet K. Patra, Huma Nasrat, Binita Goswami, Anju Jain. Vitamin D as a predictor of insulin resistance in Polycystic Ovarian Syndrome. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2012, 6:146-9.
 72. Moridi, I., Chen, A., Tal, O., & Tal, R. The Association between Vitamin D and Anti-Müllerian Hormone: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2020, 12(6):1567.
 73. Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S. Interleukin-6: designingspecific therapeutics for a complex cytokine. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018, 17:395-412.
 74. Mihaela P, Cătălina B, Adela P, Dumitrița R, Corina I. Antiangiogenic cytokines as potential new therapeutic targets for retinopathy in diabetic retinopathy. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018, 12:1985-96.
 75. Mohammad Ghodsi, Vida Hojati, Armin Attaranzade, Bitra Saifi. A Cross-sectional Study on the Follicular Fluid Concentration of Some Interleukins and Clinical Factors in Polycystic Ovary Syndrome Patients. *International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences*. 2021, 9:124-9.
 76. Jones ASK, Shikanov A. Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid. *Journal of Biological Engineering*. 2019, 13:2.
 77. Kollmann Z, Schneider S, Fux M, Bersinger NA, von Wolff M. Gonadotrophin stimulation in IVF alters the immune cell profile in follicular fluid and the cytokine concentrations in follicular fluid and serum. *Human Reproduction*. 2017, 32:820-31.
 78. Wu G, Bersinger NA, Mueller MD, von Wolff M. Intrafollicular inflammatory cytokines but not steroid hormone concentrations are increased in naturally matured follicles of women with proven endometriosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2017, 34:357-64.
 79. Kawasaki F, Kawano Y, Kosay Hasan Z, Narahara H, Miyakawa I. The clinical role of interleukin-6 and interleukin-6 soluble receptor in human follicular fluids. *Clinical and Experimental Medicine*. 2003, 3:27-31.

80. DeMatos D, Tran CA, Kagan D, Nataraja S, Palmer S. Interleukin-6(IL-6) induces cumulus expansion and improves oocyte competence when present during mouse in vitro oocyte maturation(IVM). *Biology of Reproduction*. 2008, 78:311.
81. Qin L, Xu W, Li X, Meng W, Hu L, Luo Z, et al. Differential expression profile of immunological cytokines in local ovary inpatients with polycystic ovarian syndrome: analysis by flow Cytometry. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2016, 197:136-41.
82. Liu Z, de Matos DG, Fan HY, Shimada M, Palmer S, Richards JS. Interleukin-6: an autocrine regulator of the mouse cumulus oocyte complex expansion process. *Endocrinology*. 2009, 150:3360-8.
83. Wu R, Fujii S, Ryan NK, Van der Hoek KH, Jasper MJ, Sini I, et al. Ovarian leukocyte distribution and cytokine/chemokine mRNA expression in follicular fluid cells in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2007, 22:527-35.
84. Altun T, Jindal S, Greenfield K, Shu J, Pal L. Low follicular fluid IL-6 levels in IVF patients are associated with increased likelihood of clinical pregnancy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2011, 28:245-51.
85. Bou Nemer L, Shi H, Carr BR, Word RA, Bukulmez O. Effect of single-dose ibuprofen on follicular fluid levels of interleukins in poor responders undergoing in vitro fertilization. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2019, 65:48-53.
86. Semeniuk LM, Likhachov VK, Yuzvenko TY, Dobrovolska L, Caplan Em C, Makarov OG. Risk markers of reproductive loss in women with hyperandrogenism. *Wiadomości Lekarskie*. 2018, 71:1550-3.
87. Banerjee J, Sharma R, Agarwal A, Maitra D, Diamond MP, Abu-Soud HM. IL-6 and mouse oocyte spindle. *PLoS One*. 2012, 7(4):e35535.
88. Alhilali MJS, Parham A, Attaranzadeh A, Amirian M, Azizzadeh M. IL-5 in follicular fluid as a negative predictor of the intracytoplasmic sperm injection outcome. *Cytokine*. 2019, 113:265-71.
89. Singh AK, Dutta M, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Intrafollicular interleukin-8, interleukin-12, and adrenomedullin are the promising prognostic markers of oocyte and embryo quality in women with endometriosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016, 33:1363-72.
90. Asimakopoulou B, Abu-Hassan D, Metzen E, Al-Hasani S, Diedrich K, Nikolettos N. The levels of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*. 2008, 90:60-4.
91. Artur Wdowiak, Edyta Wdowiak, Iwona Bojar. Evaluation of trace metals in follicular fluid in ICSI-treated patients. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2018, 25(2):213-18.
92. Tali Silberstein, Oshra Saphier, Ofra Paz-Tal, Liliana Gonzalez, David L. Keefe, and James R. Trimarchi. Trace element concentrations in follicular fluid of small follicles differ from those in blood serum, and may represent long-term exposure. *Fertility and Sterility*. 2009, 91: 1771-4.
93. Capcarová M. and Kolesárová A. Trace elements in follicular fluid and their effects on reproductive functions. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2012, 1:1039-44.

94. Clausen MJ, Poulsen H. Sodium/Potassium homeostasis in the cell. *Metal Ions in Life Sciences*. 2013;12:41-67.
95. Mehmet Okan Özkaya, Mustafa Nazıroğlu, Cihan Barak, Murat Berkkanoglu. Effects of Multivitamin/Mineral Supplementation on Trace Element Levels in Serum and Follicular Fluid of Women Undergoing in Vitro Fertilization (IVF). *Biological Trace Element Research*. 2011, 139:1-9.
96. Özkan Özdamar, İsmet Gün, Serdar Hira, Belgin Devranoğlu. Assessment of the relationship between follicular fluid calcium ion concentration and reproductive outcomes. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*. 2015, 4(6):1984-7.
97. Satish Kumar Adiga, Pratap Kumar and Shivananda Nayak Bijoor. Lactate dehydrogenase estimation in follicular fluid: correlation with patient age, follicle size and super ovulation in ART cycles. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2002, 105:150-4.
98. Katuska Satue, Esterina Fazio, Adriana Ferlazzo, Pietro Medica. Hematochemical Patterns in Follicular Fluid and Blood Stream in Cycling Mares: A Comparative Note. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2019, 80:20-6.
99. J.F. Aller, S.S. Callejas, R.H. Alberio. Biochemical and steroid concentrations in follicular fluid and blood plasma in different follicular waves of the estrous cycle from normal and superovulated beef cows. *Animal Reproduction Science*. 2013, 142:113-20.
100. Deka SS, Kalita DJ, Sarma S, Dutta DJ. Some biochemical constituents in follicular fluid of indigenous cows of Assam. *Veterinary World*. 2014, 7(11): 976-9.
101. Zech NH, Zech M, Baldauf S, Comploj G, Murtinger M, Spitzer D, et al. Ovarian stimulation in ART - Unwinding pressing issues. *Minerva Gynecology*. 2015, 67(2):127-47.
102. Xiao J, Su C, Zeng X. Comparisons of GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol in supposed normal ovarian responders undergoing IVF: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014, 9(9):e106854.
103. Coccia ME, Comparetto C, Bracco GL, Scarselli G. GnRH antagonists. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2004, 115:44-56.
104. Pacchiarotti A, Selman H, Valeri C, Napoletano S, Sbracia M, Antonini G, et al. Ovarian Stimulation Protocol in IVF: An Up-to-Date Review of the Literature. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2016, 17(4):303-15.
105. Gordts S, Van Turnhout C, Campo R, Puttemans P, Valkenburg M, Gordts S. A prospective randomised study comparing a GnRH-antagonist versus a GnRH- agonist short protocol for ovarian stimulation in patients referred for IVF. *Facts, views & vision in ObGyn*. 2012, 4(2):82-7.
106. Gindoff PR, Hall JL, Stillman RJ. Ovarian suppression with leuprolide acetate: comparison of luteal, follicular, and flare-up administration in controlled ovarian hyperstimulation for oocyte retrieval. *Journal of in vitro fertilization and embryo transfer*. 1990, 7(2):94-7.
107. Berker B, CI D, Kaya C, Aytac R, Satiroglu H. Comparison of the ultrashort gonadotropinreleasing hormone agonist-antagonist protocol with microdose flare -up protocol in poor responders: A preliminary study. *Journal of the Turkish German Gynecology Association Artemis*. 2010, 187-93.

108. Eftekhar M, Mohammadian F, Yousefnejad F, Khani P. Microdose GnRH agonist flare-up versus ultrashort GnRH agonist combined with fixed GnRH antagonist in poor responders of assisted reproductive techniques cycles. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2013, 6(4):266-71.
109. Kim HJ, Yoon HJ, Jang JM, Oh HS, Lee YJ, Lee WD, et al. Comparison between intracytoplasmic sperm injection and intracytoplasmic morphologically selected sperm injection in oligo-asthenoteratozoospermia patients. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 2014, 41(1):9-14.
110. Iyoke CA, Ugwu GO, Ezugwu FO, Ajah LO, Mba SG. The role of ultrasonography in in-vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Nigerian Journal of Medicine*. 2013, 22(3):162-70.
111. Fernando J. Prados, Sophie Debrock, Josephine G. Lemmen and Inge Agerholm. The cleavage stage embryo. *Human Reproduction*. 2012, 27:50-71.
112. Thorir Hardarson, Lisbet Van Landuyt, and Gayle Jones. The blastocyst. *Human Reproduction*. 2012, 27: 72-91.
113. O'Brien Y, Wingfield M, O'Shea LC. Anti-Müllerian hormone and progesterone levels in human follicular fluid are predictors of embryonic development. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2019, 17(1):47.
114. Hye Ok Kim, Nayoung Sung, In Ok Song. Predictors of live birth and pregnancy success after in vitro fertilization in infertile women aged 40 and over. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 2017, 44(2):111-117.
115. Gonzalez-Foruria I, Penarrubia J, Borrás A, Manau D, Casals G, Peralta S, et al. Age, independent from ovarian reserve status, is the main prognostic factor in natural cycle in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 2016, 106(2):342-347.
116. Crosignani PG, Ragni G, Parazzini F, Wyssling H, Lombroso G, Perotti L. Anthropometric indicators and response to gonadotrophin for ovulation induction. *Human Reproduction*. 1994, 9(3):420-3.
117. Brewer C J, Balen A H. The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction*. 2010, 140(3), 347-364.
118. McClamrock HD. The great weight debate: do elevations in body mass index (BMI) exert a negative extraovarian effect on in vitro fertilization outcome?. *Fertility and sterility*. 2008, 89(6), 1609-10.
119. C. Gnoth, A.N. Schuring, K. Friol, J. Tigges, P. Mallmann, E. Godehardt, Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Human Reproduction*. 2008, 1359-65.
120. Drakopoulos P, Blockeel C, Stoop D, Camus M, de Vos M, Tournaye H, Polyzos NP. Conventional ovarian stimulation and single embryo transfer for IVF/ICSI. How many oocytes do we need to maximize cumulative live birth rates after utilization of all fresh and frozen embryos?. *Human Reproduction*. 2016, 31(2):370-6.
121. Chalumeau C, Moreau J, Gatimel N, Cohade C, Lesourd F, Parinaud J, Leandri R. Establishment and validation of a score to predict ovarian response to stimulation in IVF. *Reproductive BioMedicine Online*. 2018, 36(1):26-31.
122. Pizarro BM, Cordeiro A, Reginatto MW, Campos SPC, Mancebo ACA, Areas PCF, Antunes RA, Souza MDCB, Oliveira KJ, Bloise FF, Bloise E, Fortunato RS, Ortiga-

- Carvalho TM. Estradiol and Progesterone Levels are Related to Redox Status in the Follicular Fluid During in vitro Fertilization. *Journal of the Endocrine Society*. 2020, 4(7):bvaa064.
123. Borowiecka M, Wojsiat J, Polac I, Radwan M, Radwan P, Zbikowska HM. Oxidative stress markers in follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Systems biology in reproductive medicine*. 2012, 58(6):301-5.
 124. Oral O, Kutlu T, Aksoy E, Ficicioğlu C, Uslu H, Tuğrul S. The effects of oxidative stress on outcomes of assisted reproductive techniques. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2006, 23(2):81-5.
 125. Ozkan S, Jindal S, Greenseid K, et al. Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 2010, 94(4):1314-9.
 126. Firouzabadi RD, Rahmani E, Rahsepar M, Firouzabadi MM. Value of follicular fluid vitamin D in predicting the pregnancy rate in an IVF program. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2014, 289(1):201-6.
 127. Aleyasin A, Hosseini MA, Mahdavi A, et al. Predictive value of the level of vitamin D in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive technology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2011, 159(1):132-7.
 128. Younis A, Clower C, Nelsen D, et al. The relationship between pregnancy and oxidative stress markers on patients undergoing ovarian stimulations. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2012, 29(10):1083-9.
 129. Timeva T, Milachich T, Antonova I, Arabaji T, Shterev A, Omar HA. Correlation between number of retrieved oocytes and pregnancy rate after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm infection. *Scientific World Journal*. 2006, 6:686–90.
 130. van der Gaast MH, Eijkemans MJ, van der Net JB, de Boer EJ, Burger CW, van Leeuwen FE, Fauser BC, Macklon NS. Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reproductive BioMedicine Online*. 2006, 13:476-80.
 131. Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Human Reproduction*. 2011, 26:1768-74.
 132. Baker VL, Brown MB, Luke B, Conrad KP. Association of number of retrieved oocytes with live birth rate and birth weight: an analysis of 231,815 cycles of in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 2015, 103:931-8.
 133. Briggs R, Kovacs G, MacLachlan V, Motteram C, Baker HW. Can you ever collect too many oocytes? *Human Reproduction*. 2015, 30:81-7.
 134. Wen X, Li D, Tozer AJ, Docherty SM, Iles RK. Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010, 11(8):117.
 135. Eppig JJ, Wigglesworth K, O'Brien MJ: Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *Journal of reproduction and fertility*. 1992, 95:119-27.
 136. Teissier MP, Chable H, Paulhac S, Aubard Y: Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability. *Human Reproduction*. 2000, 15:2471-77.

137. Halim B, Lubis HP, Novia D, Thaharuddin M. Does oval oocyte have an impact on embryo development in in vitro fertilization?. *JBRA Assisted Reproduction*. 2017, 21(1):15-18.
138. Heiligkeit Martyna, Eichenlaub-Ritter Ursula. Preantral follicle culture and oocyte quality. *Reproduction, Fertility and Development*. 2017, 30:18-43.
139. Cortvrindt, R. G., and Smitz, J. E. Follicle culture in reproductive toxicology: a tool for in-vitro testing of ovarian function?. *Human Reproduction Update*. 2002, 8:243-54.
140. Sun, F., Betzendahl, I., Shen, Y., Cortvrindt, R., Smitz, J., and Eichenlaub-Ritter, U. Preantral follicle culture as a novel in vitro assay in reproductive toxicology testing in mammalian oocytes. *Mutagenesis*. 2004, 19:13-25.
141. Picton, H. M., Harris, S. E., Muruvi, W., and Chambers, E. L. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*. 2008, 136:703-15.
142. Hsueh, A. J., Kawamura, K., Cheng, Y., and Fauser, B. C. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews*. 2015, 36:1-24.
143. Green, L. J. and Shikanov, A. In vitro culture methods of preantral follicles. *Theriogenology*. 2016, 86:229-38.
144. Silva, J. R., van den Hurk, R. and Figueiredo, J. R. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domestic Animal Endocrinology*. 2016, 55:123-135.
145. Guzel, Y. and Oktem, O. Understanding follicle growth in vitro: are we getting closer to obtaining mature oocytes from in vitro-grown follicles in human? *Molecular Reproduction and Development*. 2017, 84:544-59.
146. Karabulut S, Korkmaz O, Kutlu P, Gozel HE, Keskin I. Effects of follicular fluid oxidative status on human mural granulosa cells, oocyte competency and ICSI parameters. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2020, 252:127-136.
147. Abbas AM, Hussein RS, Elsenity MA, Samaha II, El Etriby KA, Abd El-Ghany MF, Khalifa MA, Abdelrheem SS, Ahmed AA, Khodry MM. Higher clinical pregnancy rate with in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in treatment of non-male factor infertility: Systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2020, 49(6):101706.
148. Bukulmez O, Yarali H, Yucel A, Sari T, Gurgan T. Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization for patients with a tubal factor as their sole cause of infertility: a prospective, randomized trial. *Fertility and Sterility*. 2000, 73:38-42.
149. Poehl M, Holagschwandtner M, Bichler K, Krischker U, Jürgen S, Feichtinger W. Clinical assisted reproduction: IVF-Patients with nonmale factor “To ICSI” or “Not to ICSI” that is the question? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2001, 18(4):207–10.
150. Speyer B, O'Neill H, Saab W, Seshadri S, Cawood S, Heath C, Gaunt M, Serhal P. In assisted reproduction by IVF or ICSI, the rate at which embryos develop to the blastocyst stage is influenced by the fertilization method used: a split IVF/ICSI study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2019, 36(4):647-54.
151. Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction*. 2002, 17:184-9.

152. Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction*. 2002;17:184-9.
153. Stimpfel M, Jancar N, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. Conventional IVF improves blastocyst rate and quality compared to ICSI when used in patients with mild or moderate teratozoospermia. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2019, 65(6):458-64.
154. De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, Wyns C, Mocanu E, Motrenko T, Scaravelli G, Smeenk J, Vidakovic S, Goossens V and European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE: the European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Human Reproduction*. 2018, 33(9): 1586–1601.
155. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Fertility and Sterility*. 2008, 90(5):S187.
156. Zhu, L. H., Ni, X. B., Lin, F., Xu, Z. P., Fang, J. S., & Zhang, N. Y. The impact of follicle-flushing during oocyte collection on embryo development of in-vitro fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2019, 17(1):106.
157. Huo X, Chen D, He Y, Zhu W, Zhou W, Zhang J. Bisphenol-A and Female Infertility: A Possible Role of Gene-Environment Interactions. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2015, 12(9):11101–16.
158. Ji J, Liu Y, Tong XH, Luo L, Ma J, Chen Z. The optimum number of oocytes in IVF treatment: an analysis of 2455 cycles in China. *Human Reproduction*. 2013, 28(10):2728-34.
159. Nakamura M, Yamashita Y, Hayashi A, Saito N, Yu M, Hayashi M, et al. Analyzing the risk factors for a diminished oocyte retrieval rate under controlled ovarian stimulation. *Reproductive Medicine and Biology*. 2017, 16(1):40-4.
160. Magnusson A, Kallen K, Thurin-Kjellberg A, Bergh C. The number of oocytes retrieved during IVF: a balance between efficacy and safety. *Human Reproduction*. 2018, 33(1):58-64.
161. Steward RG, Lan L, Shah AA, Yeh JS, Price TM, Goldfarb JM, et al. Oocyte number as a predictor for ovarian hyperstimulation syndrome and live birth: an analysis of 256,381 in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility*. 2014, 101(4):967-73.
162. Ben-Yosef D, Amit A, Azem F, Schwartz T, Cohen T, Mei-Raz N, et al. Prospective randomized comparison of two embryo culture systems: P1 medium by irvine scientific and the cook IVF medium. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* . 2004, 21(8):291-5.
163. Sunderam S, Kissin DM, Flowers L, Anderson JE, Folger SG, Jamieson DJ, et al. Assisted reproductive technology surveillance 2009; *MMWR Surveillance Summaries*. 2012, 61(7):1–23.
164. Ratnam SS, Devendra S, Marshall B, Anandkumar C, Wong YC, Goh HH, et al. Stimulation regimens in Assisted Reproductive Technology (ART) programme: experience in the University Hospital, Singapore. *Annals of the Academy of Medicine of Singapore*. 1993, 22(3):351–4.

165. Zhao J, Zhang Q, Li Y. The effect of endometrial thickness and pattern measured by ultrasonography on pregnancy outcomes during IVF-ET cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012, 10:100.
166. Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Endometrial pattern, thickness and growth in predicting pregnancy outcome following 3319 IVF cycle. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014, 29(3):291-8.
167. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, D'Angelo D, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reproductive BioMedicine Online*. 2008, 16(6):835-41.
168. Swain JE, Pool TB. New pH-buffering system for media utilized during gamete and embryo manipulations for assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online*. 2009, 18(6):799-810.
169. Kovacic B, Sajko MC, Vlaisavljević V. A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility*. 2010, 94(2):511-9.
170. Swain JE. Decisions for the IVF laboratory: Comparative analysis of embryo culture incubators. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014, 28(5):535-47.
171. Swain JE. Is there an optimal pH for culture media used in clinical IVF? *Human Reproduction Update*. 2012, 18(3):333-9.
172. Marianowski P, Szymusik I, Grzechocinska B, Cyganek A. The comparison of two different embryo culture methods in the course of in vitro fertilization program. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2007, 45(1):115-7.
173. Ebner T, Shebl O, Moser M, Mayer RB, Arzt W, Tews G. Group culture of human zygotes is superior to individual culture in terms of blastulation, implantation and life birth. *Reproductive BioMedicine Online*. 2010, 21(6):762-8.
174. Nijs M, Creemers E, Cox A, Janssen M, Vanheusden E, Van Der Elst J, et al. Relationship between hyaluronic acid binding assay and outcome in ART: A pilot study. *Andrologia*. 2010, 42(5):291-6.
175. Gougeon A. Dynamics of human follicular growth: morphologic, dynamic, and functional aspects. *Ovary*. 2004, 2:25-43.
176. Ambekar AS, Nirujogi RS, Srikanth SM, Chavan S, Kelkar DS, Hinduja I, et al. Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis. *Journal Proteome*. 2013, 87:68-77.
177. Kushnir MM, Naessén T, Wanggren K, Hreinsson J, Rockwood AL, Meikle AW, et al. Exploratory study of the association of steroid profiles in stimulated ovarian follicular fluid with outcomes of IVF treatment. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2016, 162:126-33.
178. Russell DL, Gilchrist RB, Brown HM, Thompson JG. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players? *Theriogenology*. 2016, 86(1):62-8.
179. Ozawa M, Nagai T, Somfai T, Nakai M, Maedomari N, Miyazaki H, et al. Cumulus cell-enclosed oocytes acquire a capacity to synthesize GSH by FSH stimulation during in vitro maturation in pigs. *Journal of Cellular Physiology*. 2010, 222(2):294-301.

180. Mori T, Amano T, Shimizu H. Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. *Biology of Reproduction*. 2000, 62(4):913-9.
181. Tatemoto H, Muto N, Sunagawa I, Shinjo A, Nakada T. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biology of Reproduction*. 2004, 71(4):1150-7.
182. Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*. 2000, 63(3):805-10.
183. Matos L, Stevenson D, Gomes F, Silva-Carvalho JL, Almeida H. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Molecular Human Reproduction*. 2009, 15(7):411-9.
184. Coticchio G, Dal-Canto M, Mignini-Renzini M, Guglielmo MC, Brambillasca F, Turchi D, et al. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproduction Update*. 2015, 21(4):427-54.
185. Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CL. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Human Reproduction Update*. 2015, 21(6):711-26.
186. Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and Sterility*. 2013, 99(4):979-97.
187. Fragouli E, Lalioti MD, Wells D. The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility. *Human Reproduction Update*. 2014, 20(1):1-11.
188. Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Molecular Human Reproduction*. 2010, 16(8):531-8.
189. Thompson JG. The impact of nutrition of the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. *Journal of Reproduction and Development*. 2006, 52(1):169-75.
190. Hamamah S, Matha V, Berthenet C, Anahory T, Loup V, Dechaud H, et al. Comparative protein expression profiling in human cumulus cells in relation to oocyte fertilization and ovarian stimulation protocol. *Reproductive BioMedicine Online*. 2006, 13(6):807-14.
191. Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guerif F, Bidault R, Royere D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Human Reproduction*. 2007, 22(12):3069-77.
192. Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A, et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Human Reproduction*. 2008, 23(5):1118-27.
193. Zang L, Zhang Q, Zhou Y, Zhao Y, Lu L, Jiang Z, et al. Expression pattern of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in human cumulus granulosa cells (CGCs) of patients with PCOS. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2016, 62(3):184-91.
194. Huang Z, Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Molecular Human Reproduction*. 2010, 16(10):715-25.

195. Ruvolo G, Fattouh RR, Bosco L, Brucculeri AM, Cittadini E. New molecular markers for the evaluation of gamete quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2013, 30(2):207-12.
196. Lv Y, Du S, Huang X, Hao C. Follicular fluid estradiol is an improved predictor of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer outcomes. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2020, 20(6):131.
197. Rodgers RJ and Irving Rodgers HF. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction*. 2010, 82(6), 1021-9.
198. Ruiz de Assín R, Clavero A, Gonzalvo MC, Ramírez JP, Zamora S, Fernández A, Martínez L and Castilla JA: Comparison of methods to determine the assigned value in an external quality control programme for embryo evaluation. *Reproductive BioMedicine Online*. 2009, 19(6): 824-9
199. Nardo LG, Gelbaya TA, Wilkinson H, Roberts SA, Yates A, Pemberton P and Laing I: Circulating basal anti-Mullerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 2009, 92: 1586-93.
200. Kosmas IP, Kolibianakis EM and Devroey P: Association of estradiol levels on the day of hCG administration and pregnancy achievement in IVF: A systematic review. *Human Reproduction*. 2009, 19: 2446-53.
201. Yu Ng EH, Yeung WS, Yee Lan Lau E, So WW and Ho PC: High serum oestradiol concentrations in fresh IVF cycles do not impair implantation and pregnancy rates in subsequent frozen thawed embryo transfer cycles. *Human Reproduction*. 2000, 15:250-5.
202. Mehta BN, Chimote MN, Chimote NN, Nath NM and Chimote NM: Follicular fluid anti Mullerian hormone (FF AMH) is a plausible biochemical indicator of functional viability of oocyte in conventional in vitro fertilization (IVF) cycles. *Journal Human Reproduction Science*. 2013, 6:99-105.
203. Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, et al. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Human Reproduction*. 2002, 17(4):1017-22.
204. Taheripanah R, Zamaniyan M, Meybodi MK, Amir-Arjmand MH, Mansouri A, Taheripanah A, Malih N. Are intra follicular estradiol and oocytes quality in women undergoing assisted reproductive technology different between the right and left ovaries? An observational study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2019, 3:100047.
205. Nagy B, Poto L, Farkas N, Koppan M, Varnagy A, Kovacs K, Papp S, Bohonyi N, Bodis J. Follicular fluid progesterone concentration is associated with fertilization outcome after IVF: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*. 2019, 38(6):871-882.
206. Salehnia, M., Zavareh, S. The effects of progesterone on oocyte maturation and embryo development. *International journal of fertility and sterility* 2013, 7:74-81.
207. Wen, X., Li, D., Tozer, A.J., Docherty, S.M., Iles, R.K. Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010, 8:117.
208. Barrera, D., Avila, E., & Díaz, L. Papel inmunológico de la progesterona en el mantenimiento del embarazo [Immunological role of progesterone in the maintenance of

- pregnancy]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 2007, 59(2):139-45.
209. Loutradis, D., Beretsos, P., Arabatzi, E., Anagnostou, E., Drakakis, P. The role of steroid hormones in art. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2008, 112:1-4.
 210. Sengupta, J., Ghosh, D. Role of progesterone on peri-implantation stage endometrium-embryo interaction in the primate. *Steroids*. 2000, 65:753-62.
 211. Basuino, L., Silveira, C.F.Jr. Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assisted Reproduction*. 2016, 20:38-40.
 212. Revelli, A., Delle Piane, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., Rinaudo, P. Follicular fluid content and oocyte quality: From single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive biology and endocrinology*. 2009, 7:40.
 213. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009, 7:40.
 214. Suchanek E, Simunic V, Juretic D, Grizelj V. Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. *Fertility and Sterility*. 1994, 62(2):347-52.
 215. Rosen MP, Zamah AM, Shen S, Dobson AT, McCulloch CE, Rinaudo PF, Lamb JD, Cedars MI. The effect of follicular fluid hormones on oocyte recovery after ovarian stimulation: FSH level predicts oocyte recovery. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009, 23:7:35.
 216. Kushnir MM, Naessén T, Wanggren K, Hreinsson J, Rockwood AL, Meikle AW, Bergquist J. Exploratory study of the association of steroid profiles in stimulated ovarian follicular fluid with outcomes of IVF treatment. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2016, 162:126-33.
 217. J.D. Lamb, A.M. Zamah, S. Shen, C. McCulloch, M.I. Cedars, M.P. Rosen, Follicular fluid steroid hormone levels are associated with fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*. 2010, 94:952-7.
 218. L. Pacella, D.L. Zander-Fox, D.T. Armstrong, M. Lane, Women with reduced ovarian reserve or advanced maternal age have an altered follicular environment, *Fertility and Sterility*. 2012, 98:986-94.
 219. F. Magata, M. Horiuchi, R. Echizenya, R. Miura, S. Chiba, M. Matsui, et al., Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 2014, 144:6-13.
 220. H.A. Hussein, Z. Boryczko, H. Bostedt, Acid-base parameters and steroid concentrations in pre-ovulatory follicles and plasma of lactating dairy cows with spontaneous and synchronized oestrus or follicular cyst. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013, 48:833–839.
 221. M.P. Rosen, A.M. Zamah, S. Shen, A.T. Dobson, C.E. McCulloch, P.F. Rinaudo, et al., The effect of follicular fluid hormones on oocyte recovery after ovarian stimulation: FSH level predicts oocyte recovery. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009, 7:35.
 222. Abo El-Maaty AM, Abd El-Gawad MH. Follicle growth, ovulation rate, body weight change, and antioxidant and metabolic status in three fat-tailed sheep breeds fed a half-maintenance diet. *Open Access Animal Physiology*. 2014, 6:21-31.

223. Zhang X, Xu X, Li P, Zhou F, Kong L, Qiu J, Yuan Z, Tan J. TMT Based Proteomic Analysis of Human Follicular Fluid From Overweight/Obese and Normal-Weight Patients With Polycystic Ovary Syndrome. *Frontiers Endocrinology (Lausanne)*. 2019, 10:821.
224. Khan FA, Das GK, Pande M, Mir RA, Shankar U. Changes in biochemical composition of follicular fluid during reproductive acyclicity in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Reproduction Science*. 2011, 127:38-42.
225. Jitender K. Bhardwaj, Rajnesh K. Sharma and Priyanka Saraf Alterations in phosphatases and antioxidant enzymes' activity in follicular fluid and granulosa cells during follicular Atresia in Goat (*Capra Hircus*) ovary. *Journal of Advanced Zoology*. 2017, 38(2):154-63.
226. Özdamar, Ö., Gün, İ., Ertuğrul, S., Özden, O., & Sofuoğlu, K. Does biochemical profile of follicular fluid in women undergoing assisted reproduction vary between the right and left ovaries. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*. 2015, 4:1066-69.
227. Adiga SK, Kumar P, Bijoor SN. Lactate dehydrogenase estimation in follicular fluid: correlation with patient age, follicle size and super ovulation in ART cycles. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2002, 105(2):150-4.
228. M. Santonastaso, A. Pucciarelli, S. Costantini, F. Caprio, A. Sorice, F. Capone, A. Natella, P. Iardino, N. Colacurci and E. Chiosi. Metabolomic profiling and biochemical evaluation of the follicular fluid of endometriosis patients. *Molecular BioSystems*, 2017, 13(6):1213–22.
229. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Human Reproduction*. 2005, 11:613-20.
230. Yang J, Yang X, Yang H, Bai Y, Zha H, Jiang F, Meng Y. Interleukin 6 in follicular fluid reduces embryo fragmentation and improves the clinical pregnancy rate. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020, 37(5):1171-6.
231. Wu G, Bersinger NA, Mueller MD, von Wolff M. Intrafollicular inflammatory cytokines but not steroid hormone concentrations are increased in naturally matured follicles of women with proven endometriosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2017, 34:357-64.
232. Qin L, Xu W, Li X, Meng W, Hu L, Luo Z, et al. Differential expression profile of immunological cytokines in local ovary in patients with polycystic ovarian syndrome: analysis by flow Cytometry. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2016, 197:136-41.
233. Liu Z, de Matos DG, Fan HY, Shimada M, Palmer S, Richards JS. Interleukin-6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell complex expansion process. *Endocrinology*. 2009, 150: 3360-8.
234. Wu R, Fujii S, Ryan NK, Van der Hoek KH, JasperMJ, Sini I, et al. Ovarian leukocyte distribution and cytokine/chemokine mRNA expression in follicular fluid cells in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2007, 22:527-35.
235. Yogesh Kumar, Saumya Prasad, Syed Akhtar Husain, Ritu Goyal, Mohammad Aasif Khan, Shashi Sharma, Sudha Prasad, "Follicular Fluid IL-6 Levels in Prediction of Successful Pregnancy Outcome in Women Undergoing IVF-ET Cycles - A Prospective Study". *International Journal of Science and Research*. 2016, 5(10):1724-32.

236. DeMatos D, Tran CA, Kagan D, Nataraja S, Palmer S. Interleukin-6 (IL-6) induces cumulus expansion and improves oocyte competence when present during mouse in vitro oocyte maturation (IVM). *Biology of Reproduction*. 2008, 78:311.
237. Wdowiak A, Wdowiak E, Bojar I. Evaluation of trace metals in follicular fluid in ICSI-treated patients. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2017, 25(2):213-8.
238. Iwata H, Hashimoto S, Ohota M, Kimura K, Shibano K, Miyake M. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction*. 2004, 127(2):159-64.
239. Costermans NGJ, Soede NM, Blokland M, van Tricht F, Keijer J, Kemp B, Teerds KJ. Steroid profile of porcine follicular fluid and blood serum: Relation with follicular development. *Physiological Reports*. 2019, 7(24):14320.
240. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009, 7:40.
241. De los Santos MJ, García-Láez V, Beltrán-Torregrosa D, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Pellicer A, Labarta E. Hormonal and molecular characterization of follicular fluid, cumulus cells and oocytes from pre-ovulatory follicles in stimulated and unstimulated cycles. *Journal Human Reproduction*. 2012, 27:1596-1605.

БИОГРАФИЈА:

Александра Стојановић удато Гавриловић, рођена је 22.07.1987. године у Параћину. Основну школу у Милошеву и Средњу медицинску школу у Ћуприји завршила је са одличним успехом. Основне студије на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу је завршила 2012. године, а затим и мастер студије 2015. године са просечном оценом 9.00 и стекла звање мастер биолог. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2014/2015 године, изборно подручје Матичне ћелије у биомедицинским наукама и положила све испите предвиђене програмом студија, укључујући и усмени докторски испит 10.12.2020. године са оценом 10 (десет), чиме је остварила просечну оцену студија 9.16.

Од 2013. године је запослена у Универзитетском клиничком центру Крагујевац, најпре као лабораторијски техничар у Служби за лабораторијску дијагностику, а од 2018. године као биолог - ембриолог у Центру за биомедицински потпомогнуту оплодњу.

Члан је Европског удружења за хуману репродукцију и ембриологију (European Society of Human Reproduction and Embryology – ESHRE). Аутор је и ко-аутор више оригиналних научних радова у часописима од међународног и националног значаја са рецензијом.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Stojanovic Gavrilovic AZ**, Cekovic JM, Parandilovic AZ, Nikolov AB, Sazdanovic PS, Velickovic AM, Andjelkovic MV, Sorak MP. IL-6 of follicular fluid and outcome of in vitro fertilization. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101(29):e29624. **M23**
2. Živanović MN, **Stojanović AZ**, Cvetković DM, Milutinović MG, Stanković MS, Marković SD. Effects of Teucrium spp. extracts on migratory potential and redox status of human colon SW-480 and breast MDA-MB-231 cancer cells. *Kragujevac J Sci*. 2016;38:161-172. **M51**
3. **Gavrilovic A**, Cekovic J, Parandilovic A, Nikolov A, Sazdanovic P, Velickovic A, Andjelkovic M and Sorak M. Steroid hormones of follicular fluid and the outcome of in vitro fertilization. *Ser J Exp Clin Res*. 2021; doi: 10.2478/sjerc-2021-0018. **M51**

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Александра Стојановић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

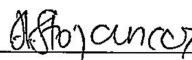
„Утицај састава фоликуларне течности на квалитет јајних ћелија и исход вантелесне оплодње“ која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу,

15.07 . 2022. године



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Александра Стојановић

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом: „Утицај састава фоликуларне течности на квалитет јајних ћелија и исход вантелесне оплодње“ која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

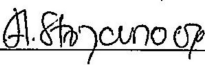
не дозвољавам¹

¹Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу,
15. 07. 2022. године



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>