

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Biljana M. Arsić

**PROCENA UTICAJA RAZLIČITIH
INKUBATORA I MEDIJUMA U TOKU
POSTUPKA VANTELESNOG OPLOĐENJA
NA ISHOD TRUDNOĆE**

doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY

Biljana M. Arsić

**SYSTEMATIC EVALUATION OF THE
EFFECTS OF INCUBATOR AND MEDIA
TYPE ON PREGNANCY OUTCOMES
FOLLOWING IN VITRO FERTILIZATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

MENTOR: Prof.dr Eliana Garalejić, ginekolog-akušer, vanredni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu,

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **Prof. dr Mladenko Vasiljević**, ginekolog-akušer, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu
2. **Prof. dr Snežana Vidaković**, ginekolog-akušer, vanredni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr Aleksandra Trninić Pjević**, ginekolog-akušer, vanredni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu

ZAHVALNICA

Posebnu zahvalnost bih želela da iskažem:

Prof. dr Eliani Garalejić, koja je osmislila ovo istraživanje, na nesebičnoj podršci i pomoći tokom istraživanja i izrade disertacije.

Dr Ivanu Soldatoviću koji mi je radio statistiku, na neizmernom strpljenju i korisnim savetima.

Lekarima, biologima i sestrama odeljenja ART GAK "Narodni front" bez kojih i ne bi bilo ovih rezultata

Svojoj porodici: roditeljima Borki i Milunu, na beskrajnoj ljubavi, na tome što su me naučili pravim životnim vrednostima, na tome što su uvek verovali u mene i uvek mi davali podršku u svemu što sam radila.

PROCENA UTICAJA RAZLIČITIH INKUBATORA I MEDIJUMA U TOKU POSTUPKA VANTELESNOG OPLOĐENJA NA ISHOD TRUDNOĆE

SAŽETAK

Cilj: Ispitati da li se razlikuju ishodi vantelesne oplodnje zavisno od vrste korišćenog inkubatora, vrste medijuma i njihovih kombinacija u toku postupka vantelesne oplodnje. Ispitati da li se razlikuju telesne mase novorođenčadi zavisno od korišćenog inkubatora, vrste medijuma i njihovih kombinacija u toku postupka vantelesnog oplođenja. Ukoliko se pokaže značajnost razlike u telesnoj masi novorođenčadi i u ishodima vantelesne oplodnje u odnosu na korišćene medijume i inkubatore, ispitati koji medijumi, inkubatori ili koja njihova kombinacija daje najbolji ishod VTO i optimalnu telesnu masu novorođenčadi.

Metodologija: u ovu studiju su bile uključene sve pacijentkinje lečene na Odeljenju za arteficielne reproduktivne tehnologije (ART) Ginekološko-akušerske klinike “Narodni front” u okviru Nacionalnog programa vantelesne oplodnje u vremenskom periodu od devet godina. Studija je obuhvatila ukupno 2617 ciklusa vantelesne oplodnje, od kojih je kod 74 pacijentkinje obustavljena terapija zbog neadekvatnog odgovora na stimulaciju, kod 16 pacijentkina aspiracijom nisu dobijene jajne ćelije, 8 pacijentkina je imalo neupotrebljive jajne ćelije za oplodnju, a 21 muškarac nije dao uzorak sperme. Tako da je analizirano 2498 ciklusa vantelesnog oplođenja. Na osnovu vrste inkubatora i korišćenog medijuma pacijentkinje su podeljene u tri grupe. Prva grupa ispitivanih pacijentkinja u čijoj procedure su korišćeni Cook medijumi i Heracell inkubator (N=1134). Druga grupa ispitivanih pacijentkinja u čijoj proceduri su korišćeni Medicult medijumi i Heracell inkubator (N=697). Treća grupa ispitivanih pacijentkinja u čijoj proceduri su korišćeni Cook medijumi i K-Minc (Cook) inkubatori (N=667). Analizirani su sledeći podaci o pacijentkinjama: godine života, BMI, pušački status, etiologija infertiliteta, broj prethodno uradjenih vantelesnih oplodnji. Analizirani su sledeći podaci vazani za postupak VTO: vrste protokola stimulacije, ukupna količina datih gonadotropina, dužina stimulacije, serumske vrednosti estradiola na dan završne injekcije, broj dobijenih jajnih ćelija, procenat oplodjenih jajnih ćelija, ukupan broj embriona, broj visoko kvalitetnih embriona, broj transferisanih embriona, dan embryo

transfera. Analizirani su ishodi vantelesnog oplodjenja u zavisnosti od vrste korišćenih medijuma i vrste korišćenih inkubatora, odnosno njihove kombinacije.

Rezultati: Logistički regresioni modeli sa kliničkom trudnoćom kao ishodom su pokazali da je šansa da dođe do kliničke trudnoće za 41% veća ukoliko se radi o K-Minc inkubatoru u odnosu na Heracell inkubator i da je šansa da dođe do kliničke trudnoće za 52% veća ukoliko se radi o Cook medijumu u odnosu na Medicult medijum. Na osnovu rezultata finalnog modela, utvrđeno je da je najbolja kombinacija za kliničku trudnoću kao ishod, K-Minc + Cook, i da je za 42% veća šansa da dođe do kliničke trudnoće u odnosu na Heracell + Cook, odnosno skoro dva puta veća šansa u odnosu na Heracell + Medicult. Logistički regresioni modeli sa porođajem kao ishodom su pokazali da je šansa da se rodi dete za 9.8% veća ukoliko se radi o K-Minc inkubatoru u odnosu na Heracell i ova šansa nije statistički značajna. Takođe, je pokazano da je šansa da žena rodi dete 42% veća ukoliko se radi o Cook medijumu u odnosu na Medicult. A finalni model je pokazao da je šansa da se rodi dete manja za 28,9% ukoliko se radi o Heracell+Medicult u odnosu na Heracell+Cook i ova šansa je statistički značajna. Nasuprot tome, šansa da se rodi živo dete je 9,8% veća ukoliko se radi o K-Minc+Cook u odnosu na Heracell+Cook i ova šansa nije statistički značajna. Generalizovani linearni model sa telesnom težinom novorođenčeta kao zavisnom i prediktorima koji su se značajno razlikovali između grupa u univarijantnoj analizi je pokazala da vrsta medijuma i vrsta inkubatora nema statistički značajan uticaj na telesnu masu novorođenčadi.

Zaključak: Vrsta korišćenog medijuma ima uticaj na stopu biohemijskih, kliničkih, uznapredovalih trudnoća i stopu živorođene dece. Vrsta korišćenog medijuma nema uticaj na fertilizacionu i implantacionu stopu. Vrsta korišćenog inkubatora ima uticaj na stopu fertilizacije, stopu implantacije, stopu biohemijskih, kliničkih i uznapredovalih trudnoća, kao i na stopu živorođene dece. Vrsta korišćenog medijuma, vrsta korišćenog inkubatora, kao i njihove kombinacije nema uticaja na telesnu težinu i telesnu dužinu terminske novorođenčadi

Ključne reči: VTO, inkubatori, medijumi, ishod VTO, telesna težina dece, telesna dužina dece

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: ginekologija

SYSTEMATIC EVALUATION OF THE EFFECTS OF INCUBATOR AND MEDIA TYPE ON PREGNANCY OUTCOMES FOLLOWING IN VITRO FERTILIZATION

Abstract

Aim: To assess the effect of incubator and media type and their combinations on outcomes following in vitro fertilisation (IVF) treatment. More specifically, we aim to determine whether newborn birth weight following assisted human conception is affected by different combinations of incubator and media type. Finally, if a significant difference in birthweight and IVF outcomes is revealed depending on incubator and medium used, we aim to determine which incubator/medium combination provides the most optimal IVF outcomes, including newborn birthweight.

Methodology: This study initially included all patients treated at the Department of Artificial Reproductive Technologies (ART), Gynecology-Obstetrics Clinic “Narodni Front”, who took part in the National program for artificial conception, within a timeframe of nine years. Primarily, the study included a total of 2617 IVF cycles, while the following cases were excluded: 74 patients who discontinued treatment, due to poor stimulation response, 16 patients who had no oocytes collected following ovarian puncture, 8 patients who had unsuitable oocytes for further fertilization and 21 cases in which a sperm sample was not obtained. Therefore, a total of 2498 IVF cases were analyzed. Based on the type of incubator and medium used, patients were divided in three groups. The first group, consisted of patients for which Cook medium and the HeraCell incubator was used (n=1134). The second group comprised of patients for culture was performed in Medicult medium and the Heracell incubator (n=697). Cook medium in combination with the K-Minc (Cook) incubator was used for the third group of patients (n=667). The following patient data were analyzed: patient age, body mass index (BMI), smoker status, cause of infertility and number of previous IVF cycles. The IVF data analyzed included the following parameters: type of stimulation protocol, total administered dose of gonadotropins, duration of stimulation, total serum concentration of estradiol on the final day of injections, number of oocytes collected, number of oocytes fertilized, total number of embryos, total number of good quality embryos,

number of embryos transferred and day of embryo transfer. IVF outcomes were analyzed based on the type of incubator and medium used, as well as their combined effect.

Results: Statistical regression models with clinical pregnancy as the primary outcome, revealed that the chance of obtaining a clinical pregnancy was 41% higher when K-Minc incubators were utilized, when compared to the Heracell Incubator. Furthermore, the chance of obtaining a clinical pregnancy was 52% higher when Cook medium was used, in comparison to Medicult. Based on the results of the final model, we determined that the optimal combination for achieving a clinical pregnancy, was K-Minc + Cook, with a 42% greater chance when in comparison to the Heracell + Cook combination and a nearly two times greater chance in comparison with Heracell + Medicult. Statistical regression models with live birth as the primary outcome, revealed that the chance of live birth was higher by 9.8% when the K-Minc incubator was used, when compared to the Heracell, however this difference was not statistically significant. Furthermore, we observed that the chance of live birth increased by 42% when Cook medium was used in comparison to Medicult medium. Our final model showed that the chance of live birth decreased by 28.9% when Heracell was used in combination with Medicult, when compared to Heracell + Cook. This difference was determined to be statistically significant. In contrast, the chance of live birth was 9.8% higher, when the K-Minc + Cook combination was used, compared to Heracell + Cook, however not statistically significant. Generalized linear models including newborn birthweight, as a dependent variable and parameters that significantly differed between the groups in a univariable analysis showed that type of medium and type of incubator do not have a statistically significant effect on the birthweight of newborns.

Conclusion: The type of medium used during IVF treatment has an effect on biochemical, clinical, ongoing pregnancy, as well as live birth rates. We observed that the type of medium used had no effect on fertilization and implantation rate. We determined that the type of incubator used had an effect on fertilization, implantation, biochemical, clinical and ongoing pregnancy rates, as well as live birth rate. The type of

medium and incubator, regardless of their combination had no effect on birthweight or birth length of IVF newborns.

Keywords: IVF, incubator, medium, IVF outcomes, newborn birthweight, newborn birth length

Scientific field: Medicine

Specific Scientific Field: Gynecology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Infertilitet.....	1
1.2. Vantelesno oplodjenje (VTO)	1
1.2.1. Kontrolisana ovarijalna stimulacija (KOH)	2
1.2.2. Aspiracija jajnih ćelija.....	4
1.2.3. IVF laboratorija.....	5
1.2.3.1. Inkubatori.....	5
1.2.3.2. Medijumi.....	8
1.2.4. Načini oplodjenja jajnih ćelija.....	9
1.2.5. Embrio transfer.....	9
1.2.6. Podrška lutealne faza.....	10
1.2.7. Obustavljeni ciklusi.....	10
1.3. Ishod vantelesnog oplodjenja.....	11
1.4. Telesna težina novorođenčadi.....	12
2. CILJEVI RADA	14
3. MATERIJAL I METODE	15
3.1. Kontrolisana ovarijalna stimulacija.....	16
3.2. Laboratorijski protokol.....	18
3.2.1. Kriterijumi za odredjivanje kvaliteta embriona.....	20
3.3. Podrška lutealne faze.....	21
3.4. Statistička analiza.....	23
4. REZULTATI	25
4.1. Podaci o pacijentima.....	25
4.1.1. Starost pacijentkinja.....	25
4.1.2. Indeks telesne mase.....	26
4.1.3. Pušački status pacijentkinja.....	27
4.1.4. Trajanje infertiliteta.....	29

4.1.5. Infertilitet.....	30
4.1.6. Indikacije za VTO.....	31
4.1.7. Prethodni pokušaji VTO.....	32
4.2. Karakteristike procedure IVF.....	33
4.2.1. Protokol stimulacije.....	33
4.2.2. Trajanje stimulacije.....	34
4.2.3. Prosečna potrošnja gonadotropina.....	35
4.2.4. Prosečna vrednost estradiola na dan završne injekcije.....	36
4.2.5. Ukupan broj folikula na dan završne injekcije.....	37
4.2.6. Broj folikula većih od 17 mm na dan završne injekcije.....	38
4.2.7. Debljina endometrijuma na dan završne injekcije.....	39
4.2.8. Broj prikupljenih oocita, broj MII oocita i broj fertilizovanih oocita...39	
4.2.9. Primenjeni način oplodjenja jajnih ćelija.....	41
4.2.10. Ukupan broj embriona, broj visoko kvalitetnih embriona i udeo visoko kvalitetnih embriona u odnosu na MII oocite.....	42
4.2.11. Ispitivanje potencijalnih faktora koji utiču na broj visoko kvalitetnih embriona.....	43
4.2.12. Broj transferisanih embriona.....	44
4.2.13. Embrio transfer.....	45
4.2.14. Dan embrio transfera.....	46
4.3. Ishodi vantelesnog oplodjenja.....	47
4.3.1. Logistički regresioni modeli sa kliničkom trudnoćom kao ishodom.....	49
4.3.2. Logistički regresioni modeli sa porođajem kao ishodom.....	53
4.4. Jednoplodne trudnoće završene u terminu porođaja.....	56
4.4.1. Generalizovani linearni model sa telesnom težinom novorođenčeta.....	61
5. DISKUSIJA.....	62
6. ZAKLJUČAK.....	81
7. LITERATURA.....	82

1.UVOD

1.1 Infertilitet

Neploidnost predstavlja ozbiljan globalni problem današnjice. Prevalenca neploidnosti u svetu u zavisnosti od lokaliteta veoma varira i javlja se u 7 do 26% bračnih parova (1). U zemljama u razvoju svaki četvrti par ima problem neploidnosti. Po istraživanjima svetske zdravstvene organizacije (SZO) u 2010. godini je 48.5 miliona parova imalo problem neploidnosti (1). Ekonomski razvijene zemlje suočene su sa epidemijom infertiliteta uslovljenom promenom statusa žene u društvu. Izražena je tendencija odlaganja materinstva zbog potrebe žene da se potvrdi u profesionalnoj sferi života, potrebi da se prvo obezbedi željeni standard za potomstvo, povećane upotrebe kontraceptiva i liberizacije namernih prekida trudnoća. Prvo uspešno vantelesno oplodjenje su postigli Steptoe i Edwards, tako da se prva beba Louise Joy Brown rodila 25.07.1978. godine u Engleskoj. Danas je procedura vantelesnog oplodjenja (VTO) postala rutina u lečenju infertiliteta i za mnogobrojne parove i jedini način lečenja. Svake godine povećava se broj bračnih parova koji radi ostvarivanja trudnoće ulaze u program VTO. U svetu se godišnje obavi oko 1.500.000 procedura VTO i rodi oko 300.000 beba (1). U Srbiji oko 2000 parova godišnje ulazi u program VTO uz evidentan kontinuirani porast broja ovih procedura u poslednjih nekoliko godina. Zbog sve većeg broja postupaka vantelesne oplodnje, od izuzetnog značaja je unapređivanje bezbednosti VTO, s jedne strane za pacijentkinje koji se podvrgavaju ovoj proceduri, a s druge strane se naročita pažnja usmerava i u pogledu bezbednosti i zdravlja novorođenčadi nastalih ovim procedurama.

1.2. Vantelesno oplodjenje (VTO)

Nakon višegodišnjih bezuspešnih pokušaja, 1978. godine Steptoe i Edwards su obznanili rođenje zdrave devojčice, Louise Brown. Ona je nazvana prvom bebom “iz epruvete” i to je ostavilo značajan efekat na parove koji pokušavaju da postanu roditelji. Njeno rođenje je uvelo novu metodu u asistiranje reproduktivne tehnologije – vantelesnu oplodnju (VTO). U proteklim godinama uvećenje stope uspeha i povećani zahtevi za ovim tretmanom doveli su do dramatičnog porasta u broju dece rođene zahvaljujući

ovoj proceduri. Danas je preko 5 miliona beba rođeno uz pomoć VTO i taj broj i dalje raste, tako da u razvijenim zemljama sveta oko 1-4% novorođene dece je rođeno nakon procedure vantelesne oplodnje (2). Takođe, i poslednji izveštaj Evropskog udruženja za humanu reprodukciju i embriologiju zaključno sa 2006.godinom pokazala je da 0.8 to 4.1% svih porođaja su porođaji iz procedura ART, sa više od 3% porođaja iz IVF-a (3).

Procedura vantelesne oplodnje je visoko sofisticirana metoda koja podrazumeva timski rad ginekologa i embriologa. Ginekolog nakon pripreme para za vantelesno oplodjenje, sprovodi kontrolisanu ovarijalnu hiperstimulaciju (KOH), obavlja proceduru aspiracije jajnih ćelija i embriotransfer (ET), kao i dalje praćenje pacijenta (ordiniranje terapije za lutealnu fazu i eventualne ultravučne kontrole), dok embriolog nakon identifikacije jajnih ćelija i obrade sperme u in vitro uslovima, oplođuje jajne ćelije, jednom od dve moguće metode. Te dve metode su konvencionalni IVF (kada se u okolinu jajnih ćelija ubaci određen broj spermatozoida, te oni sami oplode jajnu ćeliju) i mikrofertilizacija (intacytoplasmatic sperm injection - ICSI), kada biolog u citoplazmu jajne ćelije ubaci spermatozoid uz pomoć specijalno dizajniranih pipeta. Nakon toga biolog obavlja identifikaciju fertilizacije (utvrđivanjem postojanja dva pronukleusa) i potom nastale embrione kultiviše 2,3 ili 5 dana, vrši selekciju embriona i embrione adekvatne za embrio transfer pripremi za tu proceduru.

1.2.1 Kontrolisana ovarijalna stimulacija (KOH)

Pod KOH se podrazumeva ordiniranje lekova, uglavnom humanih menopauzalnih gonadotropina (HMG) i / ili rekombinantnog folikulostimulirajućeg hormona (rFSH) i / ili rekombinantnog luteinizirajućeg hormona (rLH), koji imaju za cilj da u ovarijumu pacijentkinje podstaknu rast više folikula (4). U današnje vreme najčešće se primenjuju dva protokola za kontrolisanu ovarijalnu hiperstimulaciju i to: dug protokol sa GnRH agonistima i kratak protokol sa GnRH antagonistima. Takođe se mogu primenjivati u praksi i ultrakratak i kratak protokol sa GnRH agonistima.

Dug protokol započinje 21. dana ciklusa, koji prethodi ciklusu sa kontrolisanom ovarijalnom hiperstimulacijom, aplikacijom GnRH analoga. Prva klinička ispitivanja

indukcije ovulacije sa upotrebom gonadotropina i GnRH analoga objavljena su daleke 1984 g. (5). Ordiniranje GnRH analoga ima za cilj desenzibilizaciju hipotalamusa (uspostavljanje medikamentozne hipofizektomije), sprečavanju hipofize da produkuje endogene gonadotropine (FSH i LH) i omogućava nam da na taj način kompletno isključimo uticaj hipofize na ovarijum. Posle inicijalnog efekta GnRH agonista, koji se ogleda u porastu nivoa FSH, LH a potom i estradiola, takozvanog “flare up” efekta, u periodu od oko 7-10 dana od započinjanja primene GnRH analoga, dolazi do supresije endogene produkcije gonadotropina, pa kao posledica pada nivoa FSH, LH i estradiola dolazi do pojave krvavljenja. Nakon toga, se drugog ili trećeg dana krvarenja, vrši potvrda uspostavljenе supresije produkcije gonadotropina, kontrolom nivoa LH (< 5 IU/L), progesterona (< 2 nmol/l) i estradiola (< 200 pmol/l) u krvi. Istog dana se obavlja i ultrazvučni pregled vaginalnom sondom, radi određivanja debljine endometrijuma i potvrde odsustva ovarijalnih cisti koje mogu biti uzrokovane terapijom GnRH agonistima. Nakon što je potvrđena supresija, započinje se sa ordiniranjem egzogenih gonadotropina. Doza primenjenih gonadotropina zavisi od godina života pacijentkinje, njenog hormonskog statusa, ovarijalne rezerve, kao i od odgovora pacijentkinje na eventualne prethodne stimulacije (6) .

Kod kratkog protokola koriste se GnRH antagonisti koji izazivaju momentalnu blokadu GnRH receptora i brz pad LH i FSH (7). Kod kratkog protokola KOH, primena egzogenih gonadotropina započinjanje drugog ili trećeg dana menstrualnog ciklusa. Uvođenje GnRH antagonista je kod fiksnog protokola petog ili šestog dana od započinjanja stimulacije, a kod fleksibilnog protokola je od petog do dvanaestog dana stimulacije (8). Kod fleksibilnog protokola sa GnRH antagonistima, radi određivanja optimalnog dana za uvođenje GnRH antagonista, važna je ultrazvučna verifikacija postojanja folikula od 14 mm i više, kao i serumske vrednosti estradiola > 1450 pmol/l (9). Optimalna doza gonadotropina se određuje po istim principima kao i kod dugog protokola sa GnRH agonistima. Smisao uvođenja GnRH antagonista i GnRH agonista, u protokolima KOH je sprečavanje prevremenog skoka LH i započinjanja procesa ovulacije i luteinizacije, čime bi bila ugrožena stimulacija i kompletna VTO procedura.

U takozvanom “flare – up” protokolu ili kratkom protokolu sa GnRH agonistima, sa ordiniranjem GnRH agonista započinje se prvog dana menstruacije, pri čemu se u početku koristi njihov stimulatívni efekat na endogenu produkciju gonadotropina, a potom se od trećeg (10) ili petog dana ciklusa ordiniraju i gonadotropini (11). Oba leka se daju do završne injekcije. GnRH agonista je u ovom kratkom protokolu posle 7 dana ordiniranja počeo da se ponaša kao antagonist i bio je efikasan u prevenciji skoka LH.

Kod ultrakratkog protokola sa GnRH agonistima - antagonistima, GnRH agonisti se koriste prva tri dana od početka ciklusa, a gonadotropini od trećeg dana. GnRH antagonisti se ordiniraju, kao i kod kratkog protokola, od dana kada je ultrazvučno verifikovan folikul od ≥ 14 mm zaključno sa danom završne injekcije (12, 13).

Nakon nekoliko dana od započinjanja stimulacije, bez obzira na primenjeni protokol stimulacije započinje se određivanje broja i veličine folikula, debljine i kvaliteta endometrijuma pomoću ultrazvuka, kao i određivanje vrednosti estradiola u krvi. Učestalost ultrazvučnih pregleda i određivanja vrednosti estradiola u krvi, zavisi od doktrine centra u kome se sprovodi procedura vantelesnog oplođenja. Nakon registrovanog adekvatnog porasta folikula, a pod tim se podrazumeva prisustvo najmanje 3 folikula veličine 17 i više milimetara ili 18 i više milimetara (u zavisnosti od doktrine centra) i adekvatnog porasta estradiola koji korelira sa brojem vodećih folikula, daje se završna terapija tj. trigering (engl. triggering) primenom hCG-a (humani horionski gonadotropin) ili rLH-a (rekombinantni LH). Njihovom aplikacijom započinje se ovulacija, odnosno započinje se sazrevanje jajnih ćelija (prelazak jajne ćelije iz metafaze I u metafazu II mejotičke deobe, da bi se nakon 34-36h nakon aplikacije hCG-a ili rLH-a radila aspiracija jajnih ćelija.

1.2.2. Aspiracija jajnih ćelija

Aspiracija jajnih ćelija je hirurška intervencija koja se radi transvaginalno pod kontrolom ultrazvuka, u kratkotrajnoj intravenskoj anesteziji ili u analgosedaciji. U toku te procedure, aspirira se folikularna tečnost iz folikula, pomoću za to posebno dizajniranih igala, uz korišćenje specijalne vakum pumpe za aspiraciju jajnih ćelija. U

aspiriranoj folikularnoj tečnosti embriolog vrši identifikaciju jajnih ćelija uz pomoć mikroskopa smeštenog u laminarnoj komori i o tome obaveštava ginekologa.

1.2.3. IVF laboratorija

Svaka IVF laboratorija mora da bude opremljena adekvatnom opremom, neophodnom za proceduru vantelesnog oplođenja i kulturu embriona. Pod tom opremom se podrazumeva: laminarna komora (omogućava rad u sterilnim uslovim), mikroskop za identifikaciju jajnih ćelija (smešten u laminarnoj komori), inkubatori, invertni mikroskop (neophodan za ICSI), grejna tela za manipulaciju gametima i embrionima, komercijalno dostupni medijumi za kulturu gameta i embriona, potrošni material - sterilna plastična oprema koja je testirana i nema štetan uticaj na humani material i oprema za filtraciju vazduha (14).

Za besprekorno funkcionisanje IVF laboratorije, veoma je važna kontrola svakog koraka u radu, kao i održavanje konstantnim svih parametara neophodnih za nesmetan razvoj kulture embriona. Počevši od sobne temperature koja se smatra optimalnom između 20-25°C i kvaliteta vazduha u samoj laboratoriji, pa do izbora vrste inkubatora i medijuma koji se koriste za kulturu embriona. Striktna kontrola temperature nije važna samo za kulturu embriona u inkubatorima već i u toku manipulacije gametima i embrionima (15,16). Inkubatori, grejne ploče na mikroskopima, klizni grejači i grejni blokovi moraju redovno biti kalibrisani i kontrolisani tokom upotrebe kako bi se smanjila nepotrebno izlaganje embriona nepovoljnim uslovima (15,16).

Generalno je prihvaćeno da je standardno mikro okruženje u inkubatorima neophodno za nesmetan razvoj kulture embriona, temperatura od 37°C i koncentraciju gasova od O₂ 5%, ili 20%, CO₂ 5% i N₂ 90%. Teorijski bi sastav gasova i medijuma kod embriona sisara trebalo da omoguće pH od 7.2–7.4.

1.2.3.1. Inkubatori

Svođenje na minimum okruženjem uzrokovanog stresa u IVF laboratoriji od ogromnog

značaja je omogućavanje optimalnih uslova za razvoj embriona i maksimalnog uspeha same procedure. Kao rezultat te činjenice, verovatno je inkubator jedan od najvažnijih delova opreme u IVF laboratoriji, zahvaljujući činjenici da on kontroliše više karakteristika okruženja embriona, a ujedno embrioni u toku in vitro procedure provode najveći deo vremena u njima. Primarna funkcija inkubatora u IVF laboratoriji je da omogući stabilne uslove, optimalne za funkciju gameta i razvoj embriona. Da bi se postogao ovaj cilj, inkubator mora regulisati nekoliko parametara, uključujući koncentraciju gasova, temperaturu i vlažnost (17).

Kritično važna funkcija laboratorijskog inkubatora je da pouzdano obezbedi odgovarajući odnos gasova. Regulacija koncentracije CO₂ je od ključnog značaja, jer ovaj gas pomaže u regulaciji pH medijuma za kulturu embriona, a pH medijuma je veoma važan parametar koji sinifikantno može uticati na funkciju gameta i razvoj embriona. (18). Dodatno, je poznato već godinama unazad da snižena koncentracija O₂ u okruženju kulture embriona ima koristan efekat na razvoj i životinjskih i humanih embriona i ishod IVF-a (19, 20, 21). Tako moderni IVF inkubatori mogu kontrolisati i regulisati i koncentraciju CO₂ i O₂ (18).

U današnje vreme u kliničkoj upotrebi je više vrsta komercijalno dostupnih inkubatora u koje spadaju: konvencionalni inkubatori sa vratima napred, koji omogućavaju kontrolu temperature (37 °C), koncentracije CO₂ (5% i 6%) i 95% vazduha, zatim mali inkubatori sa vratima na gore, koji omogućavaju kontrolu temperature (37 °C) i koriste gotovu smešu gasova (6,1% CO₂, 5% O₂ i ostatak N₂) i EmbryoScope time-lapse inkubatori, koji omogućavaju kontrolu temperature, gasova a i kontinuirano praćenje razvoja embriona kontinuiranim snimanjem. Suštinska razlika između konvencionalnih inkubatora i inkubatora koji koriste gotovu smešu gasova je u tome što je koncentracija kiseonika veća u konvencionalnim inkubatorima i približna koncentraciji O₂ u atmosferskom vazduhu (atmosferski vazduh se sastoji od 78% N₂, 21% O₂, 0.94% argona, 0.035% CO₂, i 0.025% drugih gasova).

Utvrđeno je da embrioni pokazuju ekstremnu osetljivost na temperaturni stress. Produžena ekspozicija kulture embriona temperaturi drugačijoj od optimalnih 37 °C, smanjuje sposobnost fertilizacije (ravoja dva pronukleusa) i onemogućava sposobnost deobe ćelija, njihovog rasta, implantacije i sledstveno nastanka trudnoće. Na primer,

pad temperature od 1 °C u odnosu na optimalnu temperaturu, smanjuje sposobnost deobe embriona ali omogućava deobu jedra (multinukleacija u svakoj blastomeri). Drugim rečima, citokineza je mnogo osetljivija na varijacije temperature od mitoze. Štaviše, produžena ekspozicija embriona višim temperaturama od optimalne ima poguban efekat na njihovu citokinezu i kod normalne i kod abnormalne fertilizacije (ukoliko je prisutno više od dva pronukleusa). Mnoge studije na životinjama su pokazale da varijacije temperature unutar inkubatora utiču na embrionalni razvoj. Eng LA i sar. su pokazali da se in vivo maturacija oocita svinje bolje odvija na 39 °C nego na 37 °C (22). U svojim istraživanjima Kimmel i sar. su na zečijem modelu demonstrirali negativan uticaj povišene temperature, i pokazali su da povišena temperature u kulturi embriona može imati poguban efekat (23). Zapravo, pokazali su da ukoliko se kultura embriona zeca izlaže temperaturi koja je za 2 °C iznad temperature tela (normalna telesna temperatura zeca je 38.0 °C), da će ta eksponiranost povećanoj temperaturi proizvesti negativan uticaj na embrionalni razvoj i organogenezu (23). Abramczuk i Lopata su otkrili da se najbolja deoba humanih embriona i sledstveno najveći procenat trudnoća dešava na temperature od 36.9°C (24). Pokazali su da eksponiranost kulture embriona na temperaturi ispod 37 °C nije pogubna, ali da je uticala na usporen razvoj embriona (24). Zbog toga postoji apsolutna potreba za svakodnevnom kontrolom temperature inkubatora u IVF laboratorijama. Redovna kontrola temperature inkubatora je neophodna imajući u obzir i činjenice: a) da je teško održati stabilnom temperaturu zbog čestog otvaranja vrata inkubatora; b) da zbog pada napona struje u toku noći inkubatori i spoljni termometri pokazuju pad zadate temperature za više od 1 °C što ima za posledicu štetni efekat na deobu i razvoj embriona; c) da je dokazano da na različitim mestima unutar istog inkubatora postoji razlika u temperaturi (25). Higdon i sar. su pokazali da je kultura humanih embriona bolja, a samim tim i procenat trudnoća veći, kada se embrioni drže na srednjoj polici konvencionalnih inkubatora nego ukoliko se embrioni drže na najvišoj ili najnižoj polici (26). Precizna regulacija temperature u embriološkoj laboratoriji je od ogromnog značaja i ima za cilj da omogući nesmetan razvoj embriona, njihovu implantaciju i nastanak trudnoće, mada treba imati u vidu da i sami embrioni imaju sposobnost prilagođavanja određenom opsegu temperature unutar samog inkubatora (27).

1.2.3.2. Medijumi

Ludwig i Ringer su osmislili prvi medijum za kulturu tkiva pre oko 150 godina. To je bio jednostavan slani rastvor, koji je bio prevashodno baziran na hemijskom sastavu krvnog seruma. Druga generacija medijuma smišljena je posle više od sto godina u 1970- tim i imala je za cilj da imitira okruženje u reproduktivnom traktu žene. U 1990- tim, dizajnirana je treća generacije medijuma, sekvencijalni medijumi. Istovremeno sa usavršavanjem medijuma, postalo je jasno koliko je značajna i kontrola parametara kao što su temperatura, pH, osmolarnost i kvalitet gasova, pa samim tim i neodvojiva povezanost i interreakcija medijma i inkubatora u IVF laboratoriji (14). Suštinska razlika između jednostavnijih i sekvencijalnih medijuma je u tome što se kod sekvencijalnih medijuma, jedan medijum koristi za kolekciju i fertilizaciju jajnih ćelija i on je specijalno napravljen da obezbedi pogodnu sredinu za interakciju između spermatozoida i oocita nakon IVF inseminacije, kao prvi deo sekvencijalnog in vitro protokola kulture embriona. Nakon toga se po potvrdi fertilizacije ćelije prebacuju u drugi medijum, koji se upotrebljava za rani razvoj embriona kao drugi deo sekvencijalnog in vitro protokola kulture embriona od faze zigota (prvi dan) do drugog ili trećeg dana kultivacije, odnosno do emriotransfera ili pak do stadijuma blastociste za šta postoje specijalni medijumi.. Kod jednostavnijih medijuma jedan isti medijum se koristi za sve faze rada na kulturi embriona. Samim tim i sastavi medijuma se međusobno razlikuju i po pitanju vrste i koncentracije supstanci u svom sastavu. To se odnosi i na sadržaj amino kiselina, organskih kiselina, jona, oligoelemenata, puferskog sistema, prisustva ili odsustva humanog ili sintetskog seruma i slično.

Postoji više vrsta komercijalno dostupnih medijuma koji se upotrebljavaju u in vitro uslovima, a koji omogućavaju kako održavanje gameta, tako i razvoj embriona. Ovi medijumi se kreću u rasponu od jednostavnih rastvora do veoma kompleksnih sistema koji su adaptirani tako da imitiraju uslove kroz koje prolazi embrion u reproduktivnom traktu žene (28, 29, 30). Mnoga savremena otkrića su od ogromnog značaja u objašnjenju mnogobrojnih kompleksnih biohemijskih, fizioloških, genetskih i epigenetskih karakteristika embriona i rezultovali su inovacijama na ovom polju. Nedvosmisleno, sastav medijuma ima presudan značaj za normalan razvoj humanih embriona, a isto tako od velikog značaja je i mikrosredina u kojoj se oni razvijaju, a ona

je uslovljena karakteristikama inkubatora (31, 32, 33)._Ustanovljeno je da su ključni parametri (varijable) za medijume: pH medijuma, temperatura, osmolarnost medijuma i kvalitet gasova (17).

1.2.4. Načini oplodjenja jajnih ćelija

Pre započinjanja aspiracije jajnih ćelija, a nakon završene likvefakcije sperme, embriolozi obrađuju i pripremaju uzorak sperme odgovarajućeg partnera za prestojeće oplodjenje. Nakon završene aspiracije jajnih ćelija vrši se procena kvaliteta jajnih ćelija i jajne ćelije adekvatne za oplodnju se oplodjuju jednom od dve postojeće metode. Kovencionalni IVF podrazumeva da se na oko 3-5 jajnih ćelija stave obrađeni spermatozoidi (100.000) koji potom sami trebaju da oplodjuju jajnu ćeliju. Dok ICSI metoda podrazumeva da embriolog prvo denudira jajnu ćeliju (ukloni okolne ćelije ganuloze) i pod invertnim mikroskopom opremljenim sa mikromanipulatorom, pomoću specijalnih mikromanipulacionih pipeta, ubaci u citoplazmu jajne ćelije i to u blizini jedra prethodno selektovani i imobilisani spermatozoid (34). Nakon 16 - 20 časova od sprovedenja ovih procedura, kontroliše se da li je došlo do oplodjenja, odnosno vrši se identifikacija pronukleusa. Potom se u narednih 2, 3 ili 5 dana od aspiracije jajnih ćelija vrši kultura embriona uz njihovu svakodnevnu kontrolu. U zavisnosti od kvaliteta embriona, a u skladu sa doktrinom centra u kome se sprovodi procedura vantelesne oplodnje, embriotransfer se obavlja drugog, trećeg ili petog dana od aspiracije jajnih ćelija. Na dan embrio transfera, embriolog obavlja završnu procenu kvaliteta embriona i najbolje embrione priprema za embriotransfer. U zavisnosti od zakonske regulative a i starosti pacijentkinje, embriotransfer se radi sa 1, 2, 3 ili više embriona. Po našem Zakonu o biomedicinski potpomognutoj oplodnji, dozvoljeno je uraditi embrio transfer sa maksimalno 3 embriona.

1.2.5. Embrio transfer

Embrio transfer je završna procedura vantelesnog oplodjenja kojom se transcervikalno u kavum uterusa ubacuju izabrani tj. selektovani embrioni. Ovo je veoma osetljiva procedura koja mora biti urađena veoma pažljivo, kako ne bi došlo do povređivanja embriona, endometrijuma i/ili provociranja kontrakcija meterice. Izvodi se na taj način

što ginekolog stavlja spekulum u vaginu i priprema grlić materice, nakon čega biolog napuni kateter za embrio transfer sa odabranim embrionima i predaje ga ginekologu, koji potom kroz cervikalni kanal uterusa, uvodi kateter za embrio transfer u kavum uterusa na udaljenosti od 1-2 cm od fundusa, a potom biolog istisne embrione. Uglavnom se koriste dve tehnike embriotransfera: "free hand" tehnika i tehnika pod kontrolom ultrazvuka, kada se koristi ultrazvučno vidljiv kateter za embriotransfer (35). Takođe postoji i treća tehnika embrio transfera - transmiometijalni-transcervikalni ET, pri kojoj se embrioni istiskuju u subendometrijum. Transmiometijalni-transcervikalni embrio transfer se radi pod kontrolom ultrazvuka pri čemu se koriste specijalno dizajnirane igle za tu proceduru, kojima prolazeci kroz ceo zid materice dolazimo do subendometrijuma i potom adekvatnim kateterima napravljenim za ovu vrstu ET-a se obavi embrio transfer (36). Nakon urađenog embriotransfera, embriolog proverava da li su embrioni eventualno zaostali u katetru ili ne, a ujedno proverava i evidentira i da li je kateter čist ili u njemu ima sluzi ili tkiva endometrijuma a o tome obaveštava ginekologa. Ukoliko su embrioni ostali u kateteru, procedura mora da se ponovi.

1.2.6. Podrška lutealne faza

Ćelija granulose nakon luteinizacije predstavljaju izvor produkcije progesterona u jajniku. Tokom aspiracije jajnih ćelija, aspirira se i veliki broj ćelija granulose koje bi inače nakon luteinizacije bile odgovorne za produkciju progesterone, tako da je u procedurama vantelesne oplodnje smanjena endogena produkcija progesterona i stoga je nužna njegova suplementacija u lutealnoj fazi ciklusa. Dužina primene i doza progesterona različita je u različitim centrima, ali je ona svakako neophodna. Obično se na dan aspiracije jajnih ćelija započinje sa primenom progesteronskih preparata u cilju pripreme endometrijuma za nidaciju embriona, odnosno za njegovu transformaciju u sekretornu fazu. Na tržištu postoji više preparata progesterona koji mogu biti bilo u obliku globula, gela ili preparata za intramuskularnu primenu. Koji od ovih preparata će biti primenjen i u kom vremenskom period, zavisi od njihove dostupnosti i prakse centra koji se bavi IVF-om.

1.2.7. Obustavljeni ciklusi

Pod ovarijalnom rezervom se podrazumeva sposobnost jajnika da produkuje jajne ćelije koje mogu da budu oplodene i da potom dovedu do uspešne trudnoće. Ovarijalna rezerva je determinisana genetskim i stečenim faktorima i u negativnoj korelaciji je sa godinama starosti pacijentkinje (37). U najčešće stečene faktore spadaju operativni zahvati na jajnicima, potom pušenje, hemioterapija i radioterapija (38). U proceni ovarijalne rezerve postoji više laboratorijskih i kliničkih parametara, od kojih su najznačajniji određivanje bazalne vrednosti folikulo-stimulirajućeg hormona (FSH), određivanje vrednosti Anti-Mullerian hormona (AMH) i ultrazvučna evaluacija jajnika. Ultrazvučna evaluacija jajnika obuhvata određivanje broja antralnih folikula velicine od 2 do 8 mm (AFC) i merenje volumena jajnika (OV) (dužina x sirina x visina x 0.5). Jaiswar SP i saradnici ističu da povišene vrednosti FSH, smanjene vrednosti AMH, broj antralnih folikula koji je manji od 5–7, kao i slab odgovor na prethodnu stimulaciju, sugerišu na postojanje slabe ovarijalne rezerve (39). U pripremi pacijentkinje za IVF, evaluacija ovarijalne rezerve sugeriše potencijalni odgovor jajnika na stimulaciju, zatim određuje vrstu protokola, izbor i dozu lekova, predviđa moguće komplikacije i eventualni ishod (40). Ukoliko u toku kontrolisane ovarijalne hiperstimulacije aplikacijom gonadotropina ipak ne dolazi do porasta rasta folikula kao i ni do porasta nivoa estradiola u krvi, a po nekim autorima ukoliko dodje do pada vrednosti estradiola u periodu od uzastopno dva dana, obustavlja se dalja terapija i prekida se ciklus vantelesne oplodnje (41).

1.3. Ishod vantelesnog oplodjenja

Najznačajnijim faktorom za ishod IVF-a smatra se starost pacijentkinje, odnosno kvalitet jajnih ćelija koji je u direktnoj vezi sa godinama života pacijentkinje. Pored starosti pacijentkinje, postoje brojni faktori koji mogu uticati na uspeh vantelesne oplodnje, a u njih spadaju: pušački status, telesna težina pacijentkinje, odnosno indeks telesne mase, etiologija infertilitata, vrste protokola stimulacije, ukupne ordinirane doze gonadotropina, dužina stimulacije, debljina i kvalitet endometrijuma, vrste metode oplodjenja, kvalitet embriona, broj transferisanih embriona. U kliničkoj proceni uspeha

IVF-a se koristi procenat biohemijskih trudnoća, kliničkih trudnoća, pobačaja kao i porođaja po započetim ciklusima i po obavljenim embriotransferima.

Ukoliko je nakon 16 dana od aspiracije jajnih ćelija vrednost beta hCG-a 50 IU/L i više, smatra se da je nalaz pozitivan, odnosno da je došlo do biohemijske trudnoće.

Pod kliničkom trudnoćom se podrazumeva ultrazvučno utvrđeno prisustvo gestacionog meška ili otkucaja srca fetusa u 7 nedelji gestacije, odnosno 5 nedelja nakon embrio transfera. Pobačaji su spontani gubici trudnoće pre napunjene 20 nedelje gestacije odnosno 18 nedelja nakon fertilizacije. Prevremani porođaji su porođaji završeni rođenjem živorođenog ili mrtvorodenog novorođenčeta u periodu posle 20 gestacione nedelje a pre navršene 37 nedelje gestacije. Termenske trudnoće su trudnoće koje su završene između 37 i 42 nedelje gestacije sa živo rođenim ili mrtvo rođenim novorođenčetom (42, 43).

1.4. Telesna težina novorođenčadi

Prva osoba začeta procesom VTO će uskoro napuniti 40 godina, a mnoge osobe začete na ovaj način već imaju svoje potomstvo. Sada već zavidna vremenska distanca koja nas deli od pionirskih koraka u oblasti veštačke oplodnje omogućila je poređenje različitih karakteristika, pa tako i onih antropometrijskih, između dece nastale biomedicinski potpomognutim metodama i one nastale spontanim začećem. Poznato je da su ishodi spontano nastalih jednoplodnih trudnoća povoljniji u odnosu na jednoplodne trudnoće nastale uz pomoć metoda vantelesne oplodnje (44, 45).

Razlike u telesnoj težini na rođenju u procedurama ART mogu biti povezane sa placentnim mehanizmima restrikcije rasta. Tako su na primer, histopatološke studije posteljica, pacijentkinja koje su ostavile trudnoće nakon procedura ART-a, pokazale da su posteljice deblje kod jednoplodnih trudnoća kao i da su kod njih češće anomalije insercije pupčanika nego kod spontano nastalih trudnoća (46), dok su posteljice iz blizanačkih trudnoća iz procedura ART tanje, lakše i sa više infarkcija u odnosu na spontano nastale trudnoće (47). Števiše, uočena je veća učestalost preeklampsije, placente previje i drugih patologija povezanih sa posteljicom (peripartalna hemoragija, abrupcija posteljice i placenta accreta) u trudnoćama nakon ART-a u odnosu na opštu populaciju pacijenata (48, 49, 50).

Deca iz jednoplodnih trudnoća nastalih nakon IVF-a imaju signifikantno nižu telesnu težinu u odnosu na decu iz spontanih trudnoća, čak i kada se uzme u obzir i starost i paritet majki (51, 52, 53), mada ima autora koji tvrde da je učestalost perinatalnih komplikacija između subfertilnih žena i onih koje su zatrudnele nakon procedura ART je slična (54). Zapažanje da deca iz jednoplodnih trudnoća nastalih nakon IVF-a imaju signifikantno nižu telesnu težinu u odnosu na decu iz spontanih trudnoća je izazvalo zabrinutost zato što je niska telesna težina na rođenju udružena kako sa ranim tako i sa kasnim posledicama i bolestima (55), kao što su: tip 2 dijabetesa (56) hipertenzija (57) i kardiovaskularne bolesti (58, 59). Razmatranje mogućih uzroka, za ove opservacije, uključilo je i epigenetske alteracije uzrokovane ovarijalnom stimulacijom (60). Teorijski, niža telesna težina na rođenju dece nakon IVF-a se može pripisati: a) majčinim i/ili očevim karakteristikama udruženih sa infertilitetom; b) efektima ovarijalne stimulacije na oocite, endometrijum i endokrinologiju lutealne faze ili rane trudnoće i c) IVF laboratorijskim procedurama, kao što su ICSI ili uslovi kulture embriona (61).

Neki autori tvrde da povišen rizik od lošeg perinatalnog ishoda ima veze sa osnovnim uzrokom infertiliteta koji iziskuje primenu ART procedure, nezavisno od same procedure (51, 52, 62). Taj stav je potkrepilo i nekoliko studija koje su pokazale da pacijentkinje sa nelečenim subfertilitetom, koje su spontano ostale trudne imaju veću učestalost lošeg perinatalnog ishoda od opšte populacije, sugerišući na taj način da infertilitet sam po sebi može posredovati lošem perinatalnom ishodu koji se potom pripisuje primenjenom tretmanu. (63, 64, 65, 66). Učestalost perinatalnih komplikacija između subfertilnih žena i onih koje su zatrudnele nakon procedura ART je slična (54). Imajući u vidu da je rizik niske telesne mase na rođenju u trudnoćama nastalim vantelesnom oplodnjom značajno veći u odnosu na isti rizik kod spontano nastalih trudnoća, neophodna je sveobuhvatna i kompleksna analiza svih potencijalnih etiopatoloških faktora. Ukoliko se uzmu u obzir i rezultati studija sprovedenih na životinjama, a koji su pokazali da određeni aspekti vezani za tehnologije VTO (kao što je korišćenje različitih medijuma za kultivisanje embriona u in vitro uslovima) mogu značajno uticati na telesnu masu na rođenju, onda se može spekulirati da tehnologije VTO mogu biti odgovorne za suboptimalne ishode trudnoća nastalih vantelesnom oplodnjom, pa tako i za nižu telesnu masu na rođenju (67, 68, 69).

2. CILJEVI RADA

Planom istraživanja predviđeni su sledeći ciljevi

1. Ispitati da li se razlikuju ishodi vantelesne oplodnje zavisno od vrste korišćenog inkubatora, vrste medijuma i njihovih kombinacija u toku postupka vantelesne oplodnje
2. Ispitati da li se razlikuju telesne mase novorođenčadi zavisno od korišćenog inkubatora, vrste medijuma i njihovih kombinacija u toku postupka vantelesnog oplodjenja
3. Ukoliko se pokaže značajnost razlike u telesnoj masi novorođenčadi i u ishodima vantelesne oplodnje u odnosu na korišćene medijume i inkubatore, ispitati koji medijumi, inkubatori ili koja njihova kombinacija daje najbolji ishod VTO i optimalnu telesnu masu novorođenčadi.

3. MATERIJAL I METODE

Ovo istraživanje je obavljeno kao studija preseka u koju su bile uključene sve pacijentkinje lečene na Odeljenju za arteficijelne reproduktivne tehnologije (ART) Ginekološko-akušerske klinike "Narodni front" u okviru Nacionalnog programa vantelesne oplodnje u vremenskom periodu od 01.01.2007. pa na dalje. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Ginekološko-akušerske klinike „Narodni Front“, odluka broj 24/17-1 od 08.07.2015. godine i od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu, odluka broj 29/XI-1 od 09.11.2015.

Za uključivanje u program vantelesnog oplodjenja potrebna je kumulativna ispunjenost kriterijuma propisanih od Republičke stručne komisije Ministarstva zdravlja za postupke biomedicinski potpomognutog oplodjenja (BMPO).

Kriterijumi za uključenje u proceduru vantelesnog oplodjenja su:

- parovi kod kojih su iscrpljene druge mogućnosti lečenja neplodnosti,
- žene koje imaju neplodnost i pored odgovarajućeg lečenja,
- žene do napunjenih 40 godina do momenta dobijanja odluke o ispunjenosti uslova za uključenje u proces vantelesnog oplodjenja,
- očuvana funkcija jajnika,
- indeks telesne mase (BMI) < 30,
- svi oblici subfertilnosti muškaraca uz postojanje živih i morfološki ispravnih spermatozoida u ejakulatu.
- pacijenti koji imaju uredne sledeće analize: za oba partnera nalaze mikrobioloških i seroloških ispitivanja.
- dodatne analize za ženskog partnera su uredni rezultati hormonskih analiza, kolposkopskog pregleda sa rezultatom brisa po Papanikolau i ultrazvučnog pregleda

Kriterijumi za isključenje iz proceduru vantelesnog oplodjenja:

- parovi kod kojih nisu iscrpljene druge mogućnosti za lečenje infertiliteta, a žene imaju očuvanu ovarijalnu rezervu i mlađe su životne dobi od 38 godina,
- žene kod kojih nije očuvana rezerva jajnika,
- žene koje imaju BMI > 30,

- anomalije i benigni tumori materice, jajovoda i jajnika koji onemogućavaju proces vantelesnog oplodjenja, nastanak i razvoj trudnoće
- postojanje malignih ili tumora sumnjivih na malignitet na materici, jajovodu i jajniku
- bilo koja oboljenja (internistička, imunološka, infektološka, neurološka, psihijatrijska) ukoliko su bez dozvole za sprovođenje procedure vantelesnog oplodjenja odgovarajućeg specijaliste,
- oboljenja kod kojih bi anestezija ili trudnoća potencijalno ugrožavali život pacijentkinje,
- svi oblici muške neplodnosti kod kojih nema živih ili morfološki ispravnih spermatozoida u ejakulatu.

3.1. Kontrolisana ovarijalna stimulacija

Za kontrolisanu ovarijalnu stimulaciju na odeljenju ART, Ginekološko-akušerske klinike "Narodni front" su korišćena dva protokola, dugi GnRH agonist i kratak GnRH antagonist protokol.

Dugi GnRH agonist protokol je započinjan subkutanom (sc) administracijom GnRH-agonista (Dipherelin 0,1 mg/ml, Triptorelin, Pharma Swiss Beograd, Srbija) od 21.-og dana menstrualnog ciklusa koji prethodi ciklusu u kome će se sprovesti stimulacija ovulacije. Zbog inicijalne stimulacije FSH i LH koja se dešava na početku terapije sa GnRH agonistima ("flare" efekat), menstruacija se obično javlja 10-ak dana posle započinjanja terapije. Prvi dan krvarenja se registruje kao prvi dan ciklusa u kome će se obaviti planirana stimulacija ovulacije i odgovarajuća IVF procedura. Trećeg dana ciklusa se uzima uзорak krvi radi određivanja koncentracije estradiola, progesterona i LH. Hormoni su određivani pomoću automatskog Elecsys imunoanalajzera (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Intra-esej i inter-esej koeficijenti varijacije su 3% i 6% za LH, 5% i 10% za estradiol i 3% i 5% za progesteron. Kao dokaz postignute medikamentozne hipofizektomije, ("down" regulacija) potrebno je da vrednosti estradiola budu <200 pmol/l, progesterona < 2 nmol/l, a LH < 5 IU/L. Ako su koncentracije veće, produžava se aplikovanje GnRH-agonista u istim dozama naredna 3 dana, posle čega se opet ponavlja određivanje serumskih koncentracija E₂, P₄ i LH.

Kada se utvrdi da je "down" regulacija postignuta, nastavlja se sa administracijom GnRH agonista i započinje se stimulacija sa intramuskularnom (im) aplikacijom urinarnog hMG-a (Menopur 75i.j., Menotrofin-humani menopauzalni gonadotropin, HMG, Ferring Pharmaceuticals, Fering B.V.) i/ili rekombinantnog FSH (Gonal-F 75i.j., Folitropin alfa, Merck Srono, Modugno, Italija i/ili Puregon 50 i.j. i 100 i.j., Folitropin beta, Mreck Sharp & Dohme, Beograd, Srbija). Startna doza gonadotropina je zavisila od godina starosti pacijentkinje, njene procenjene rezerve jajnika i od njenog odgovora na prethodne stimulacije. Opseg startne doze je bio od 150 do 300 i.j. gonadotropina. Fiksna inicijalna doza se održava prva 3 dana stimulacije. Od četvrtog dana od započinjanja KOS-a, mere se svakodnevno vrednosti estradiola u krvi uz kontinuirano praćenje rasta folikula ultrazvučnim pregledom vaginalnom sondom i zavisno od vrednosti estradiola i ultrazvučnog nalaza podešavaju se ordinirane doze gonadotropina.

U kratom protokolu KOS koristili smo GnRH antagonist (Cetrotide 0.25 mg/ml, Cetroreliks acetat, Merck Srono, Frankfurt, Nemačka) u cilju prevencije prevremenog LH skoka i to fleksibilni protokol sa GnRH antagonistima. KOS je započinjana drugog dana menstrualnog ciklusa urinarnim (Menopur 75i.j., Menotrofin-humani menopauzalni gonadotropin, HMG, Ferring Pharmaceuticals, Fering B.V.) i/ili rekombinantnim gonadotropinima (Gonal-F 75i.j., Folitropin alfa, Merck Srono, Modugno, Italija i/ili Puregon 50 i.j. i 100 i.j., Folitropin beta, Mreck Sharp & Dohme, Beograd, Srbija). Startna doza gonadotropina je zavisila od godina starosti pacijentkinje, njene procenjene rezerve jajnika i njenog odgovora na prethodne stimulacije. Opseg startne doze je bio od 225 do 450 i.j. gonadotropina i bila je fiksna u trajanju od 4 dana. Od petog dana KOS merene su vrednosti estradiola i radjen je ultrazvučni pregled vaginalnom sondom. Uz porast estradiola veći od 1450 pmol/l i/ili uz prisustvo folikula ≥ 14 mm započinjali smo aplikaciju GnRH antagonista i kontinuirano ga davali sa urinarnim i/ili rekombinantnim gonadotropinima čiju smo dozu prilagođavali odgovoru jajnika procenjivanu svakodnevnom merenjem nivoa estradila u krvi i kontinuiranim praćenjem porasta folikula ultrazvučnim pregledima vaginalnom sondom. Hormoni su određivani pomoću automatskog Elecsys imunoanalajzera (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Intra-esej i inter-esej koeficijenti varijacije su 3% i 6% za LH, 5% i 10% za estradiol i 3% i 5% za progesteron.

Završna maturacija oocita je izazivana ili sa 10 000 IU hCG (Pregnyl, Horionski gonadotropin, Merck Sharp & Dohme, Beograd, Srbija) ili sa Ovitrelle 250 mcg (Choriogonadotropin alfa, Merck Srero S.p.A. Modugno, Italija) kada je ultrazvučno verifikovan porast ≥ 3 folikula većih od 17 mm uz adekvatan porast nivoa estradiola. U slučaju slabog odgovora jajnika, kada je bio jako mali broj rastućih folikula završna maturacija oocita je izazivana i ukoliko je samo 1 folikul bio veličine 17 mm.

Aspiracija jajnih ćelija je radjena pod kontrolom ultrazvuka (Siemens Acuson X150, Siemens Medical Solutions, USA), korišćenjem aspiracione pumpe (Vacum pump IVF Ultra Quiet-COOK, Queensland Australija) i igle za aspiraciju jajnih ćelija sa duplim lumenom (Cook EchoTip Double Lumen Aspiration Needle), 35 h posle trigeringa.

3.2. Laboratorijski protokol

Na Odeljenju za Artificijelne reproduktivne tehnologije, Klinike za ginekologiju i akušerstvo „Narodni front“ u Beogradu, u postupku za vantelesno oplođenje korišćena su dva različita tipa medijuma za kulturu humanih gameta i embriona i to: Universal IVF Medium i ISM1 medijum (Medicult, Jyllinge, Denmark) od 01.01.2007. do 29.05.2009. i Cook Medical Embryo Culture Sequential System, Fertilization medium i Cleavage medium (Cook[®] Medical Inc., Ireland) od 01-05-2008. pa na dalje. Za ekvibraciju medijuma i za kultivaciju jajnih ćelija i embriona korišćeni su 2 tipa inkubatora: konvencionalni inkubator sa vratima napred i vodenim sistemom grejanja, Heracell 240 (Thermo Electron Corporation, Made in Germany) i mali inkubator sa vratima na gore, K-Minc 1000 (William a COOK Australia Pty Ltd).

Kada je korišćen Medicult medijum postupak je bio sledeći : Universal IVF Medium (Medicult, Jyllinge, Denmark) je po preporuci proizvođača upotrebljavan za prikupljanje (kolekciju) jajnih ćelija, fertilizaciju i kulturu do stadijuma od 2-8 ćelija (drugi do treći dan kultivacije) a takođe i za embriotransfer. Kod metode klasičnog vantelesnog oplođenja, aspiracijom folikula, prikupljene jajne ćelije isprane su i prebačene (maksimalno do 5 janih ćelija) u 700 μ L Universal IVF Medium. Potom je obavljena inseminacija sa 100.000 progresivno pokretnih spermatozoida. Izvor spermatozoida je bio isključivo iz svežeg ejakulata. U ICSI proceduri, jajne ćelije nakon

obavljene mikrofertilizacije su odmah prebacivane u ISM1 medijum (Medicult, Jyllinge, Denmark) i kultivisane do stadijuma od 2 do 8 blastomera u zavisnosti kada je vršen embrio transfer (drugi ili treći dan kultivacije). Ekvilibracija ovih medijuma i kultivacija jajnih ćelija i embriona vršena je u CO₂ inkubatorima Heracell 240, u atmosferi od 5% čistog CO₂ i na temperaturi od 37°C.

Kada je korišćen Cook-ov medijum postupak je bio sledeći: za kolekciju i fertilizaciju jajnih ćelija koristi se Fertilization Medium (Cook[®] Medical Inc., Ireland). Kod klasičnog metoda vantelesnog oplođenja inseminacija je vršena u Fertilization medium koji svojim sastavom obezbeđuje optimalne uslove za fuziju gameta, što čini prvi deo sekvencijalnog in vitro protokola kulture embriona, tako što se nakon aspiracije folikula, dobijene jajne ćelije isperu i prebace (maksimalno do 5 janih ćelija) u 700 µL Fertilization mediuma. Potom je obavljena inseminacija sa 100.000 progresivno pokretnih spermatozoida. Izvor spermatozoida je bio isključivo iz svežeg ejakulata. Sledećeg jutra ćelije corona cumulus kompleksa se očiste, a očišćene oplodjene jajne ćelije, po potvrdi fertilizacije se prebace u 50µl prethodno ekvilibrisane kapi Cleavage Medium (Cook[®] Medical Inc., Ireland) koji se upotrebljava za rani razvoj embriona kao drugi deo sekvencijalnog in vitro protokola kulture embriona od faze zigota (prvi dan), do drugog ili trećeg dana kultivacije, odnosno do embrio transfera. U ICSI postupku, prikupljanje jajnih ćelija se takodje obavlja u Fertilization Mediumu, a nakon obavljene mikrofertilizacije odmah se vrši prebacivanje u mikrokapi prethodno ekvilibrisanog Cleavage Medium koji se takodje upotrebljava za rani razvoj embriona kao drugi deo sekvencijalnog in vitro protokola kulture embriona od faze zigota (prvi dan), do drugog ili trećeg dana kultivacije, odnosno do embriotransfera. Ekvilibracija medijuma, kultura gameta i embriona vršena je u CO₂ inkubatorima: Heracell 240, u atmosferi od 6% čistog CO₂ i na temperature od 37°C za Cook medijume, dok je kultura embriona vršena u K-Minc 1000 inkubatorima, obavljana u tačno određenoj atmosferi smeše gasova koja sadrži 6,1% CO₂, 5% O₂ i ostatak N₂ i na temperaturi od 37°C

Provera fertilizacije jajnih ćelija vršena je nakon 16-20 sati. Normalna oplodnja (fertilizacija) je potvrđena prisustvom dva pronukleusa (haploidno jedro jajne ćelije i spermatozoida, 2PN) sa dva jasna, (vidljiva, posebna) ili fragmentisana polarna tela, a potom je razvoj embriona evaluiran svakodnevno. Embrioni su bili kultivisani u kapima

ispod ulja (Ovoil, Vitrolife, Göteborg, Sweden). Embriotransfer je radjen drugog, trećeg ili petog dana posle aspiracije jajnih ćelija.

3.2.1. Kriterijumi za odredjivanje kvaliteta embriona

Kriterijumi za odredjivanje kvaliteta embriona su bili broj blastomera, njihov oblik i veličina, stopa fragmentacije i multinukleacija blastomera. Po obliku, blastomere mogu biti pravilne ili nepravilne. Po veličini mogu biti jednake ili nejednake. Stopa fragmentacije se procenjuje na osnovu prisutnog procenta fragmentacije embriona. Embrioni se u odnosu na stopu fragmentacije dele na embrione bez fragmenata, embrione sa $\leq 10\%$ fragmenata, embrione sa $\leq 20\%$ fragmenata, embrione sa $>20 \leq 50\%$ i embrione sa $>50 - 100\%$ fragmenata.

A skor embriona označava da su blastomere međjusobno jednake, a B skor embriona označava da su blastomere međjusobno neujednačene tj. nejednake.

Kriterijumi za odredjivanje kvaliteta embriona su:

- A embrion - ima blastomere jednake po veličini (2 - 8) bez fragmenata i bez multinukleacije
- B embrion - ima blastomere nejednake po veličini (2 - 8) bez fragmenata i bez multinukleacije
- A1; B1 - embrioni sa $\leq 10\%$ fragmentacija (A su sa jednakim a B sa nejednakim veličinama blastomera)(a mogu biti sve kombinacije sa prefiksom koji označava broj blastomera 2A1,2B1, 3A1,4A1....8A1; 2B1, 3B1..8B1).
- A2; B2 - embrioni sa $>10 < 20\%$ fragmentacija (A su sa jednakim a B sa nejednakim veličinama blastomera) (a mogu biti sve kombinacije sa prefiksom koji označava broj blastomera 2A2,2B2, 3A2,4A2....8A2; 2B2, 3B2..8B2).
- A3; B3 -embrioni sa >20 do 50% fragmenata A su sa jednakim a B sa nejednakim veličinama blastomera)
- A4; B4 - embrioni sa $>50\%$ fragmenat A su sa jednakim a B sa nejednakim veličinama blastomera)
- Prefix 1,2,3,4... ispred A ili B označava broj blastomera prisutnih u embrionu (2A, i 2B, dve blastomere, 3A i 3B tri blastomere,)
- Gradacije embriona na osnovu kriterijuma za odredjivanje kvaliteta embriona su:

1. Odličan embrion koji je vrhunskog kvaliteta (Top-quality)
 - A embrioni i B – embrioni tj. embrioni bez fragmentacija, koji su 2.dana imali 3-4 blastomere, odnosno trećeg dana 6-8 blastomera
 - A1 embrioni i B1 embrioni tj. Embrioni sa ≤ 10 % fragmentacija koji su 2.dana imali 3-4 blastomere, odnosno trećeg dana 6-8 blastomera
2. Embrion koji je dobrog kvaliteta (Good quality)
 - A embrioni i B embrioni sa odgovarajućim brojem blastomera i stepena fragmentacije i sa odsustvom multinukleacije
 - svi A2 embrioni i B2 embrioni sa 2-8 blastomera
3. Embrioni prosečnog -osrednjeg kvaliteta (Fair quality)
 - A3 embrioni i B3 embrioni
4. Embrioni lošeg tj. nepovoljnog kvaliteta koji nisu za transfer (Bad quality)
 - A4 embrioni i B4 embrioni (embrioni sa visokim procentom fragmentacije)
 - embrioni koji su usporenog rasta ili sa prisutnim zastojem u razvoju (na primer embrioni trećeg dana sa 4 ili 5 blastomera)
 - embrioni sa izraženom multinukleacijom.

Selekcija embriona (odabir embriona za embriotransfer) na dan 2 je procenjena u skladu sa prethodno navedenim parametrima. Selekcija embriona na dan 3, zasnovana je takođe na gore navedenim parametrima, s tim što su prednost imali embrioni koji su pokazali ranu kompakciju.

3.3. Podrška lutealne faze

Za podršku lutealne faze korišćen je 3 x 200 mg progesterona peroralno (Utrogestan, Besins, Brussels, Belgium) i 125 mg depo progesterona intramuskularno (Progesteron depo 250 mg, hidrokspirogesteron kaproata, Galenika, Beograd, Srbija) na dan aspiracije jajnih ćelija kao i svaki dan do embriotransfera uključujući i taj dan i još 2 puta na peti dan od embriotransfera po 250 mg Depo Progesterona.

Studija je obuhvatila ukupno 2617 ciklusa vantelesne oplodnje, od kojih je kod 74 pacijentkinje obustavljena terapija zbog neadekvatnog odgovora na stimulaciju, kod 16 pacijentkinja aspiracijom nisu dobijene jajne ćelije, 8 pacijentkinja je imalo

neupotrebljive jajne ćelije za oplodnju, a 21 muškarac nije dao uzorak sperme. Tako da je analizirano 2498 ciklusa vantelesnog oplodjenja.

Na osnovu vrste inkubatora i korišćenog medijuma pacijentkinje su podeljene u tri grupe. Prva grupa ispitivanih pacijentkinja u čijoj proceduri su korišćeni Cook medijumi i Heracell inkubator (N=1134). Druga grupa ispitivanih pacijentkinja u čijoj proceduri su korišćeni Medicult medijumi i Heracell inkubator (N=697) . Treća grupa ispitivanih pacijentkinja u čijoj proceduri su korišćeni Cook medijumi i K-Minc (Cook) inkubatori (N=667).

Analizirani su sledeći podaci o pacijentkinjama: godine života, BMI, pušački status, etiologija infertiliteta, broj prethodno uradjenih vantelesnih oplodnji.

Analizirani su sledeći podaci vazani za postupak VTO: vrste protokola stimulacije, ukupna količina datih gonadotropina, dužina stimulacije, serumske vrednosti estradiola na dan završne injekcije, broj dobijenih jajnih ćelija, procenat oplodjenih jajnih ćelija, ukupan broj embriona, broj visoko kvalitetnih embriona, broj transferisanih embriona, dan embrio transfera.

Analizirani su ishodi vantelesnog oplodjenja u zavisnosti od vrste korišćenih medijuma i vrste korišćenih inkubatora, odnosno njihove kombinacije.

Ishod vantelesnog oplodjenja je definisan kao stope biohemijskih trudnoća, kliničkih trudnoća, stopa implantacija, stope uznapredovalih trudnoća, stope pobačaja, udeo prevremenih porođaja, porođaji u terminu, stopa živorođene dece. Pod biohemijском trudnoćom je podrazumevana vrednost β hCG >50 u serumu 16 dana posle aspiracije jajnih ćelija, pod kliničkom trudnoćom je podrazumevana ultrazvučno utvrđena trudnoća u 7. gestacijskoj nedelji (dijagnostikovana ultrazvučnim pregledom vaginalnom sondom, pri čemu je utvrđeno prisustvo gestacionog meška ili otkucanja srca ploda), stopa implantacija (broj gestacionih meškova utvrđenih ultrazvučnim pregledom vaginalnom sondom podeljen sa brojem transferisanih embriona), pod uznapredovalom trudnoćom je podrazumevana ultrazvučno verifikovana trudnoća u 12. nedelji gestacije. Pod pobačajem su podrazumevani spontani ili indukovani gubici trudnoće pre napunjene 20 nedelje gestacije odnosno 18 nedelja nakon fertilizacije, prevremeni porodjaji (porodjaj završen rođjenjem živorođjenog ili mrtvorodjenog novorođjenčeta u periodu posle 20 gestacione nedelje, a pre navršene 37 nedelje gestacije) kao i termiski porođaj (živo rođjeno ili mrtvo rođjeno novorođjenče

porodjeno između 37 i 42 nedelje gestacije) i telesna masa novorođenčeta. Takođe, su registrovani svi relevantni podaci o toku trudnoće do porođaja. Nisku telesnu masu novorođenčeta predstavlja telesna masa novorođenčeta ispod 2,500 g, veoma nisku telesnu masu novorođenčeta predstavlja telesna masa novorođenčeta ispod 1,500 g, ekstremno nisku telesnu masu novorođenčeta predstavlja telesna masa novorođenčeta ispod 1,000 g.

Analiza uticaja različitih vrsta medijuma i inkubatora na telesnu masu na rođenju neće obuhvatiti pacijentkinje sa višeplođnim trudnoćama, prevremenim porođajem, mrtvorodenom decom, kao i stanjima u trudnoći koja mogu imati uticaja na telesnu masu novorođenčadi (svi oblici šećerne bolesti, povišen arterijski pritisak, gestoze, intrauterini zastoj u rastu ploda, nestajući blizanci). Tako da će analizom biti obuhvaćena samo terminska novorođenčad i to njih 335. Prva grupa u čijoj proceduri su korišćeni Cook medijumi i Heracell inkubator (N=157). Druga grupa u čijoj proceduri su korišćeni Medicult medijumi i Heracell inkubator (N=87) i treća grupa novorođenčadi u čijoj proceduri su korišćeni Cook medijumi i Cook inkubatori (N=91).

3.4. Statistička analiza

U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode.

Od deskriptivnih, korišćeni su:

- apsolutni i relativni brojevi (n, %)
- mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana)
- mere disperzije (standardna devijacija, interval varijacije)

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su testovi razlike i analiza povezanosti.

Testovi razlike korišćeni u ovoj studiji su:

- parametarski (t-test, ANOVA)
- neparametarski (Hi-kvadrat test, Kruskal-Wallis test).

Za testiranje razlike između pojedinih grupa korišćena su naknadna testiranja sa Bonferroni korekcijom.

Povezanost binarne ishodne varijable sa prediktorima je analizirana binarnom logističkom regresionom analizom, dok je povezanost numeričke ishodne varijable sa ostalim prediktorima analizirana linearnom regresionom analizom.

Svi rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Svi podaci su obrađeni u SPSS 20.0 (IBM korporacija) softverskom paketu.

4. REZULTATI

Studija je obuhvatila ukupno 2498 cilkusa vantelesnog oplođenja. Od ukupnog broja, 1134 (45,4%) pacijentkinja je bilo u grupi Heracell + Cook, 697 (27,9%) pacijentkinja je bilo u grupi Heracell + Medicult, dok je 667 pacijentkinja (26,7%) bilo u K-Minc + Cook grupi.

4.1. Podaci o pacijentima

4.1.1. Starost pacijentkinja

Deskriptivna statistika starosti pacijentkinja u odnosu na ispitivane grupe je prikazana u tabeli 1.

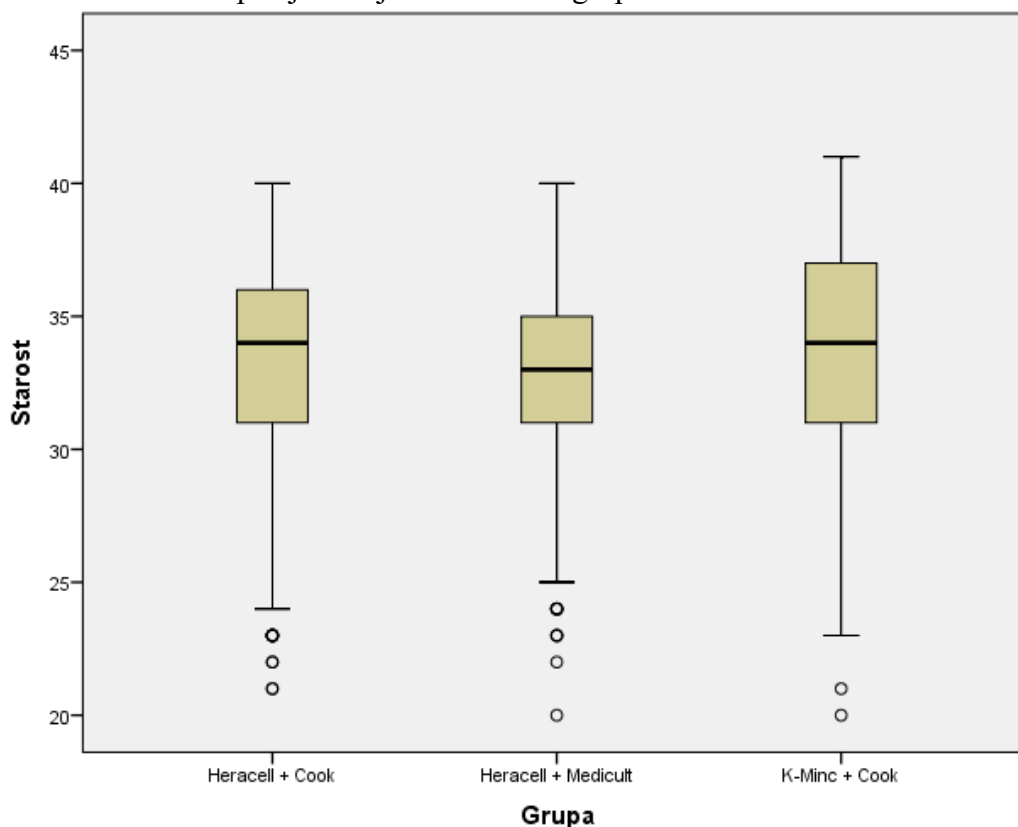
Tabela 1. Starost pacijentkinja u odnosu na grupe

Grupa	A.S.	SD	Median	Minimu m	Maksimu m
Heracell + Cook	33.42	3.86	34	21	40
Heracell + Medicult	32.64	3.17	33	20	40
K-Minc + Cook	33.95	3.96	34	20	41
Ukupno	33.35	3.74	34	20	41

Iz tabele vidimo da je prosečna starost pacijentkinja vrlo slična u sve tri grupe pacijentkinja, ali obzirom da se radi o velikim uzorcima i malim standardnim devijacijama, razlika između grupa je statistički značajna ($F=24,639$; $p<0,001$). Naknadnim poređenjima je utvrđeno da je razlika značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult ($p<0,001$), između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook ($p=0,018$), kao i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$).

Distribucija pacijentkinja u odnosu na starost je i grafički prikazana (Grafikon 1).

Grafikon 1. Starost pacijentkinja u odnosu na grupe



4.1.2. Indeks telesne mase

Deskriptivna statistika indeksa telesne mase u odnosu na ispitivane grupe je prikazana u tabeli 2.

Tabela 2. BMI u odnosu na grupe

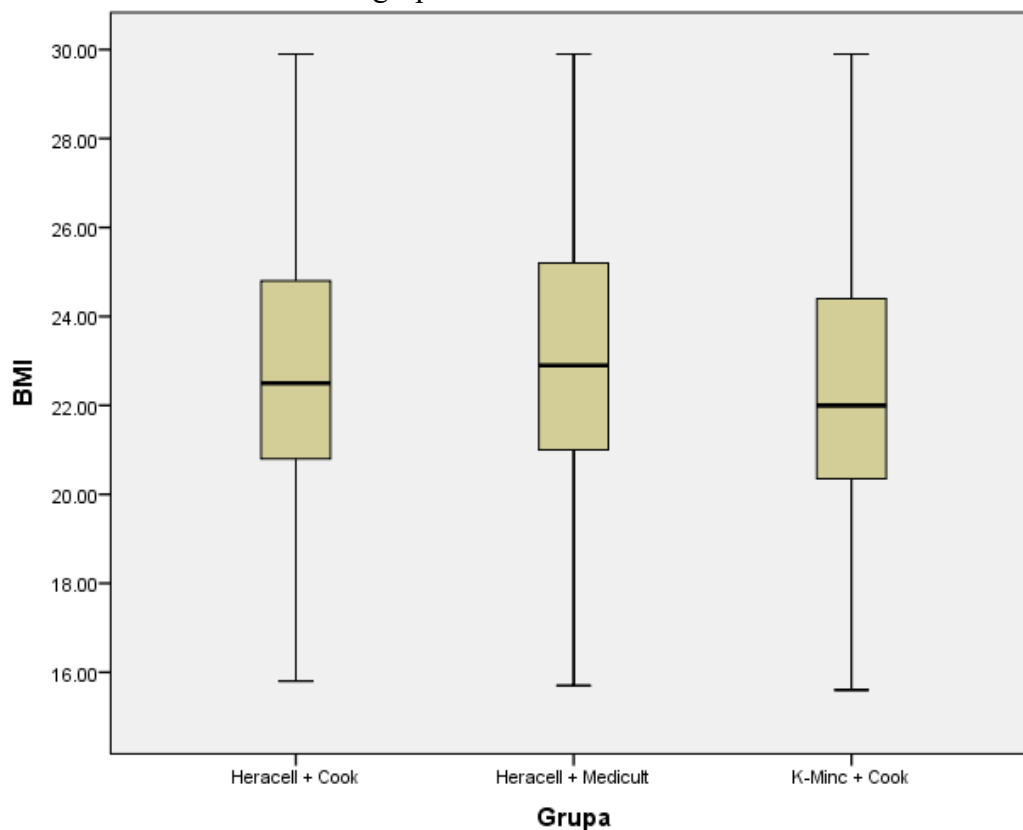
Grupa	A.S.	SD	Median	Minimum m	Maksimu m
Heracell + Cook	23.00	3.02	22.50	15.80	29.90
Heracell + Medicult	23.26	3.13	22.90	15.70	29.90
K-Minc + Cook	22.46	2.90	22.00	15.60	29.90
Ukupno	22.93	3.04	22.50	15.60	29.90

Iz tabele vidimo da je prosečan BMI vrlo sličan u sve tri grupe pacijentkinja, ali obzirom da se, kao i u prethodnoj analizi, radi o velikim uzorcima i malim standardnim devijacijama, razlika između grupa je statistički značajna ($F=12,315$; $p<0,001$).

Naknadnim poređenjima je utvrđeno da razlika nije značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult ($p=0,241$), značajna je između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook ($p=0,001$), kao i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$).

Distribucija pacijentinja u odnosu na BMI je i grafički prikazana (Grafikon 2).

Grafikon 2. BMI u odnosu na grupe



4.1.3. Pušački status pacijentkinja

Distribucija pacijentkinja po grupama u odnosu na pušački status je prikazana u tabeli 3.

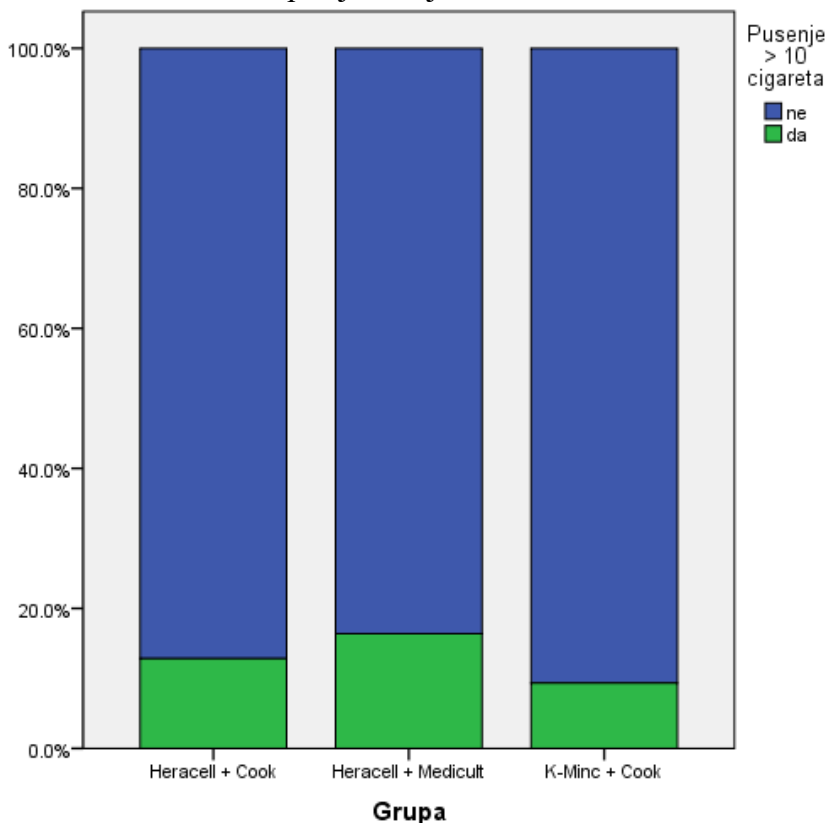
Tabela 3. Pušački status pacijentkinja

		Pušenje > 10 cigareta		Ukupno	
		ne	da		
Grupa	Heracell + Cook	N	884	130	1014
		%	87.2%	12.8%	100.0%
	Heracell + Medicult	N	551	108	659
		%	83.6%	16.4%	100.0%
	K-Minc + Cook	N	553	57	610
		%	90.7%	9.3%	100.0%
Ukupno	N	1988	295	2283	
	%	87.1%	12.9%	100.0%	

Iz tabele se vidi da je najviše pušača bilo u drugoj grupi, zatim u prvoj i najmanje u trećoj grupi. Hi-kvadrat testom je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa ($X^2=13,986$; $p<0,001$).

Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 3).

Grafikon 3. Pušački status pacijentkinja



4.1.4. Trajanje infertiliteta

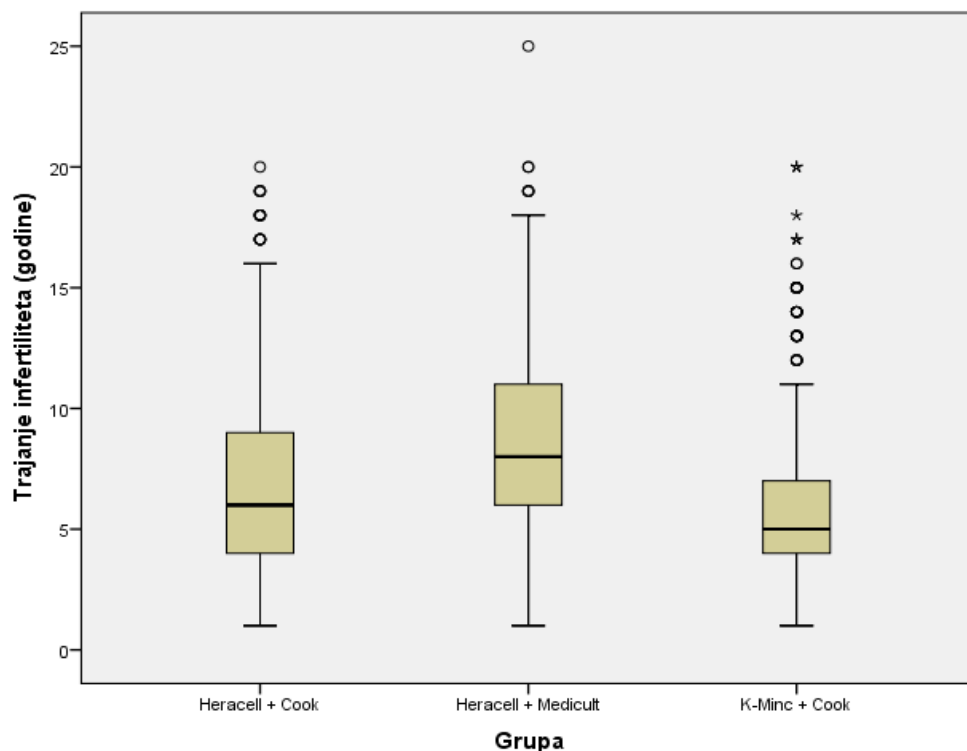
Deskriptivna statistika trajanja infertiliteta u odnosu na ispitivane grupe je prikazana u tabeli 4.

Tabela 4. Trajanje infertiliteta

Grupa	A.S.	SD	Median	Minimu m	Maksimu m
Heracell + Cook	6.90	3.67	6.00	1	20
Heracell + Medicult	8.76	3.87	8.00	1	25
K-Minc + Cook	5.89	3.32	5.00	1	20
Ukupno	7.15	3.79	6.00	1	25

Iz tabele se vidi da je prosečno trajanje infertiliteta, kao i medijana, najduže u grupi Heracell + Medicult, dok je najkraće u grupi K-Minc + Cook. Ova razlika je statistički značajna ($X^2=223,136$; $p<0,001$). Naknadnim poređenjima je utvrđeno da je razlika značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult ($p<0,001$), između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$), kao i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$). Distribucija pacijentinja u odnosu na trajanje infertiliteta je i grafički prikazana (Grafikon 4)

Grafikon 4. Trajanje infertiliteta



4.1.5. Infertilitet

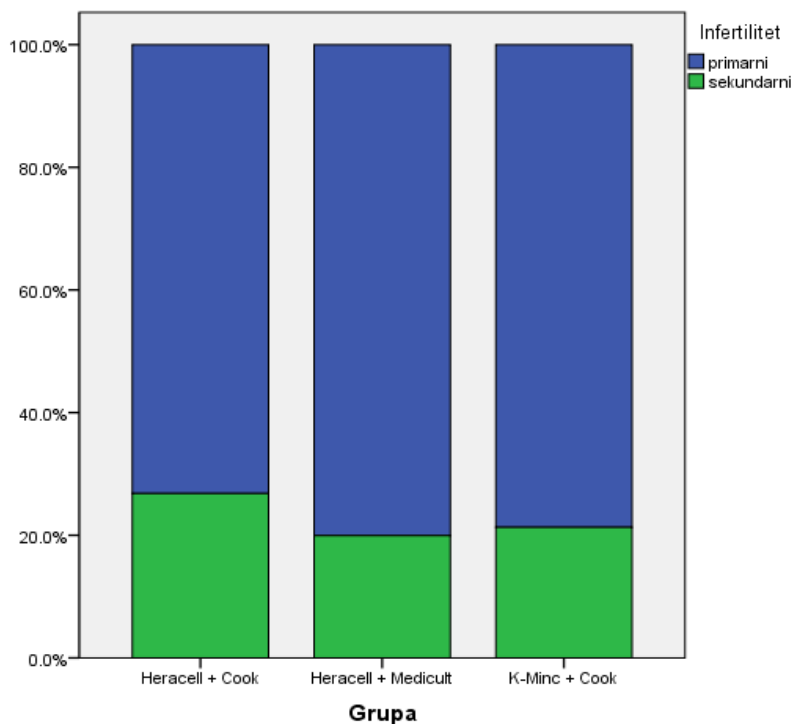
Distribucija pacijentkinja prema primarnom ili sekundarnom infertilitetu je prikazana u tabeli 5.

Tabela 5. Infertilitet

		Infertilitet		Ukupno
		primarni	sekundarni	
Heracell + Cook	N	830	304	1134
	%	73.2%	26.8%	100.0%
Heracell + Medicult	N	558	139	697
	%	80.1%	19.9%	100.0%
K-Minc + Cook	N	525	142	667
	%	78.7%	21.3%	100.0%
Ukupno	N	1913	585	2498
	%	76.6%	23.4%	100.0%

Iz tabele se vidi da je sekundarni infertilitet načešći u prvoj grupi ispitivanih pacijentkinja, dok su druga i treća vrlo slične. Ova razlika je statistički značajna ($X^2=13,645$; $p=0,001$). Distribucija je i grafički prikazana (Grafikon 5).

Grafikon 5. Infertilitet



4.1.6. Indikacije za VTO

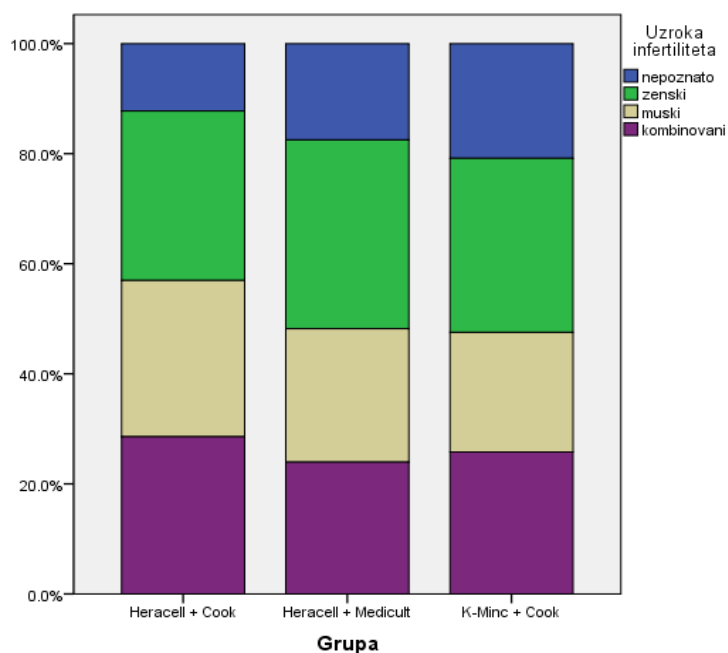
Kada se analiziraju pacijentkinje po grupama u odnosu na indikacije za VTO dobijaju se sledeći rezultati prikazani u tabeli 6.

Tabela 6. Indikacije za VTO

Grupa		N	Indikacije za VTO				Ukupno
			nepoznat	zenski	muski	kombinovan	
			o	i			
Heracell + Cook	N		139	349	322	324	1134
	%		12.3%	30.8%	28.4%	28.6%	100.0%
Heracell + Medicult	N		122	239	169	167	697
	%		17.5%	34.3%	24.2%	24.0%	100.0%
K-Minc + Cook	N		139	211	145	172	667
	%		20.8%	31.6%	21.7%	25.8%	100.0%
Ukupno	N		400	799	636	663	2498
	%		16.0%	32.0%	25.5%	26.5%	100.0%

Evidentno je da postoje razlike u distribuciji po ispitivanim grupama, a analizirajući ove podatke hi-kvadrat testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između grupa po indikacijama za VTO ($X^2=33,881$; $p<0,001$). Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 6).

Grafikon 6. Indikacije za VTO



4.1.7. Prethodni pokušaji VTO

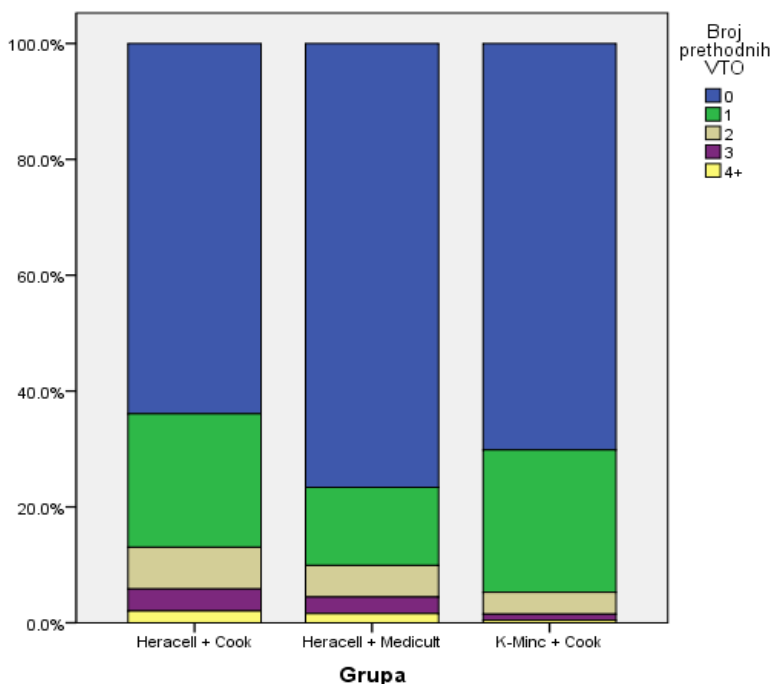
Distribucija pacijentkinja po ispitivanim grupama u odnosu na prethodne pokušaje vantelesnog oplodjenja je prikazana u tabeli 7.

Tabela 7. Prethodni pokušaji VTO

		Broj prethodnih VTO					Ukupno	
		0	1	2	3	4+		
Grupa	Heracell + Cook	N	725	261	82	43	23	1134
		%	63.9%	23.0%	7.2%	3.8%	2.0%	100.0%
	Heracell + Medicult	N	534	94	38	20	11	697
		%	76.6%	13.5%	5.5%	2.9%	1.6%	100.0%
	K-Minc + Cook	N	468	164	25	7	3	667
		%	70.2%	24.6%	3.7%	1.0%	0.4%	100.0%
Ukupno	N	1727	519	145	70	37	2498	
	%	69.1%	20.8%	5.8%	2.8%	1.5%	100.0%	

Iz tabele se vidi da se radi o varijabilnim distribucijama, pri čemu su pacijentkinje prve grupe imale najveći procenat prethodnih pokušaja vantelesnog oplodjenja. Testiranjem, hi-kvadrat testom, je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika ($X^2=26,831$; $p<0,001$). Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 7).

Grafikon 7. Prethodni pokušaji VTO



4.2. Karakteristike procedure IVF

4.2.1. Protokol stimulacije

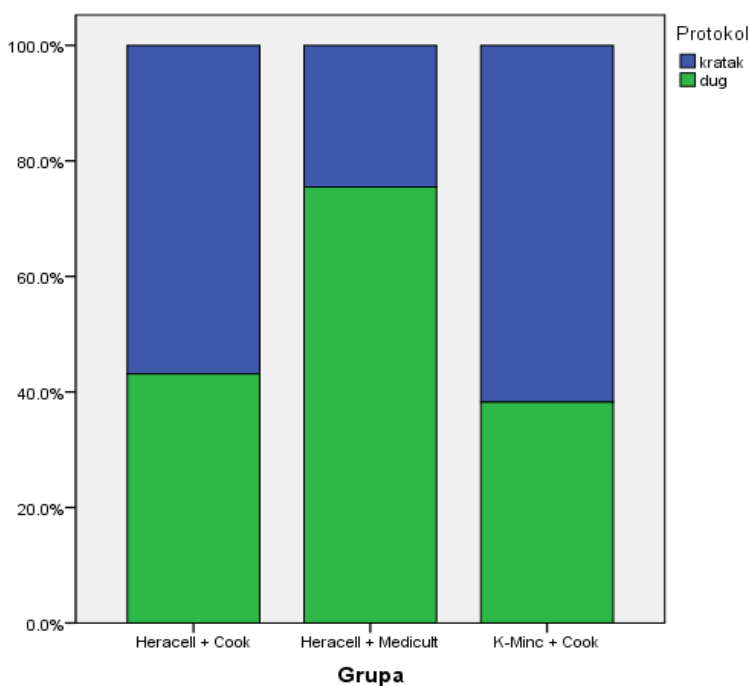
Distribucija pacijentkinja u odnosu na protokol po ispitivanim grupama je prikazana u tabeli 8.

Tabela 8. Protokol

		Protokol stimulacije		Ukupno
		kratak	dug	
Heracell + Cook	N	645	489	1134
	%	56.9%	43.1%	100.0%
Heracell + Medicult	N	171	526	697
	%	24.5%	75.5%	100.0%
K-Minc + Cook	N	412	255	667
	%	61.8%	38.2%	100.0%
Ukupno	N	1228	1270	2498
	%	49.2%	50.8%	100.0%

Najčešće je dug protokol bio zastupljen u drugoj grupi pacijentkinja, dok je u najmanjem procentu bio zastupljen u trećoj grupi pacijentkinja. Na osnovu rezultata statističkog testa je utvrđeno da je ova razlika statistički značajna ($X^2=238,587$; $p<0,001$). Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 8).

Grafikon 8. Protokol stimulacije



4.2.2. Trajanje stimulacije

Deskriptivna statistika trajanja stimulacije u odnosu na ispitivane grupe je prikazana u tabeli 9.

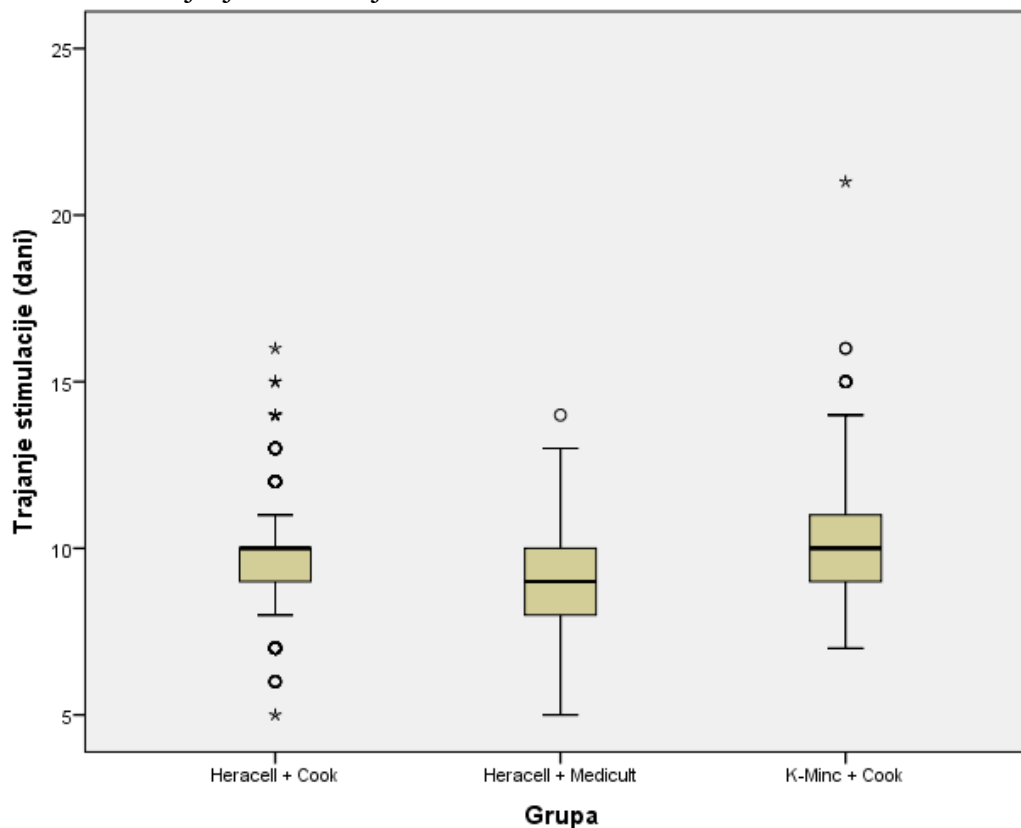
Tabela 9. Trajanje stimulacije

Grupa	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
Heracell + Cook	9.55	1.281	10.00	5	16
Heracell + Medicult	9.17	1.259	9.00	5	14
K-Minc + Cook	9.96	1.536	10.00	7	21
Ukupno	9.55	1.379	10.00	5	21

Iz tabele se vidi da su prosečne vrednosti slične, kao i medijane. Ali, obzirom da se radi o velikim uzorcima, očekivano je da i ove male razlike budu statistički značajne ($F=54,622$; $p<0,001$). Naknadnim poređenjima grupa, svake sa svakom utvrđeno je da su sve razlike statistički značajne.

Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 9).

Grafikon 9. Trajanje stimulacije



4.2.3. Prosečna potrošnja gonadotropina

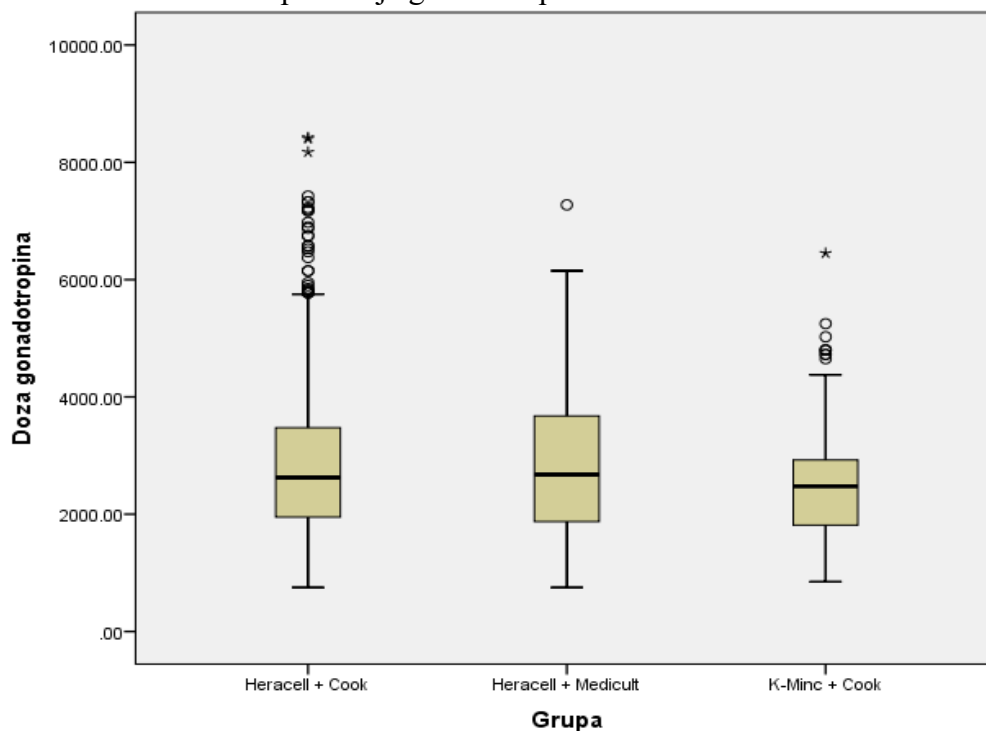
Deskriptivna statistika prosečna potrošnja gonadotropina u odnosu na ispitivane grupe je prikazana u tabeli 10.

Tabela 10. Prosečna potrošnja gonadotropina

Grupa	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
Heracell + Cook	2826.5	1215.6	2625	750	8425
Heracell + Medicult	2849.9	1216.5	2675	750	7275
K-Minc + Cook	2442.8	791.3	2475	850	6450
Ukupno	2730.6	1131.5	2600	750	8425

Evidentno je da je prosečna potrošnja gonadotropina između prve dve grupe vrlo slične, ali poslednja ima nešto manju prosečnu vrednost, odnosno medijanu. Statističkom analizom je utvrđeno da postoji značajna razlika između ispitivanih grupa po prosečnoj potrošnji gonadotropina ($X^2=38,206$; $p<0,001$). Naknadnim poređenjima je utvrđeno da nema značajne razlike između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult ($p=1,000$), postoji između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$), kao i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$). Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 10).

Grafikon 10. Prosečna potrošnja gonadotropina



4.2.4. Prosečna vrednost estradiola na dan završne injekcije

Deskriptivna statistika prosečne vrednosti estradiola na dan završne injekcije u odnosu na ispitivane grupe je prikazana u tabeli 11.

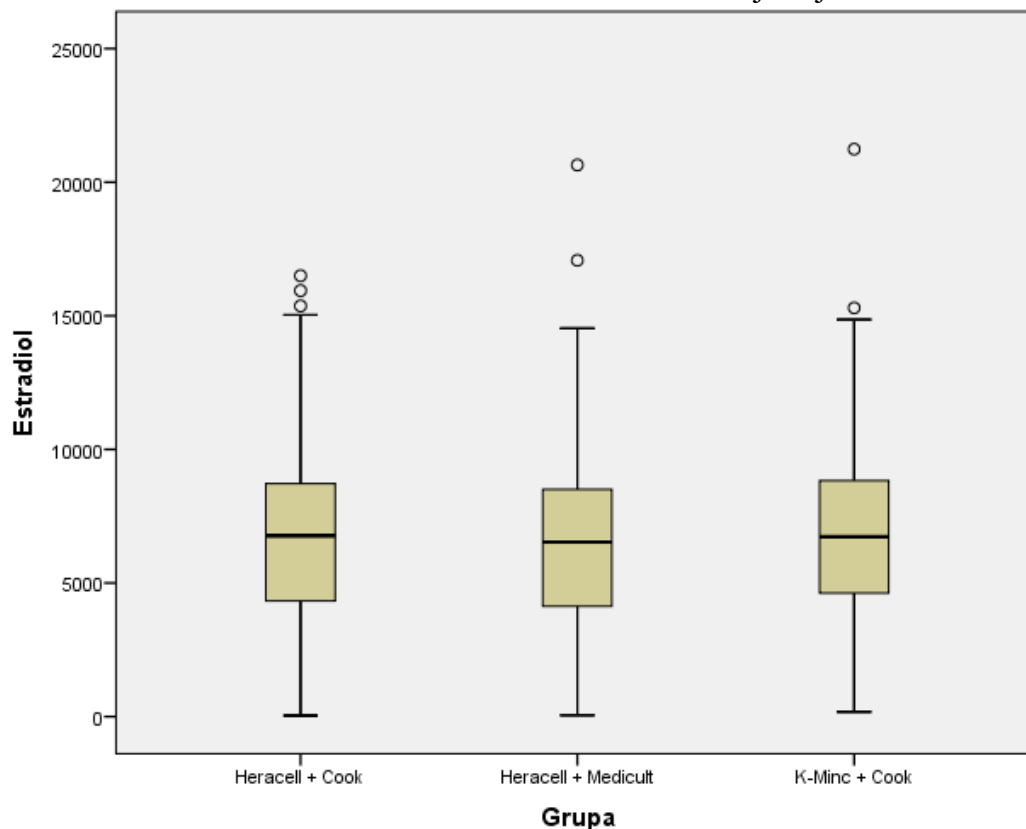
Tabela 11. Prosečna vrednost estradiola na dan završne injekcije

Grupa	A.S.	SD	Median	Minimu m	Maksimu m
Heracell + Cook	6539.5	2979.2	6768.0	37	16501
Heracell + Medicult	6524.2	3097.7	6533.5	50	20644
K-Minc + Cook	6694.7	3017.8	6727.0	175	21236
Ukupno	6577.0	3022.8	6713.0	37	21236

Ovde je evidentno da se radi o vrlo sličnim prosečnim vrednostima. Statističkom analizom je utvrđeno da nema značajne razlike između grupa ($F=0,697$; $p=0,498$).

Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 11).

Grafikon 11. Prosečna vrednost estradiola na dan završne injekcije



4.2.5. Ukupan broj folikula na dan završne injekcije

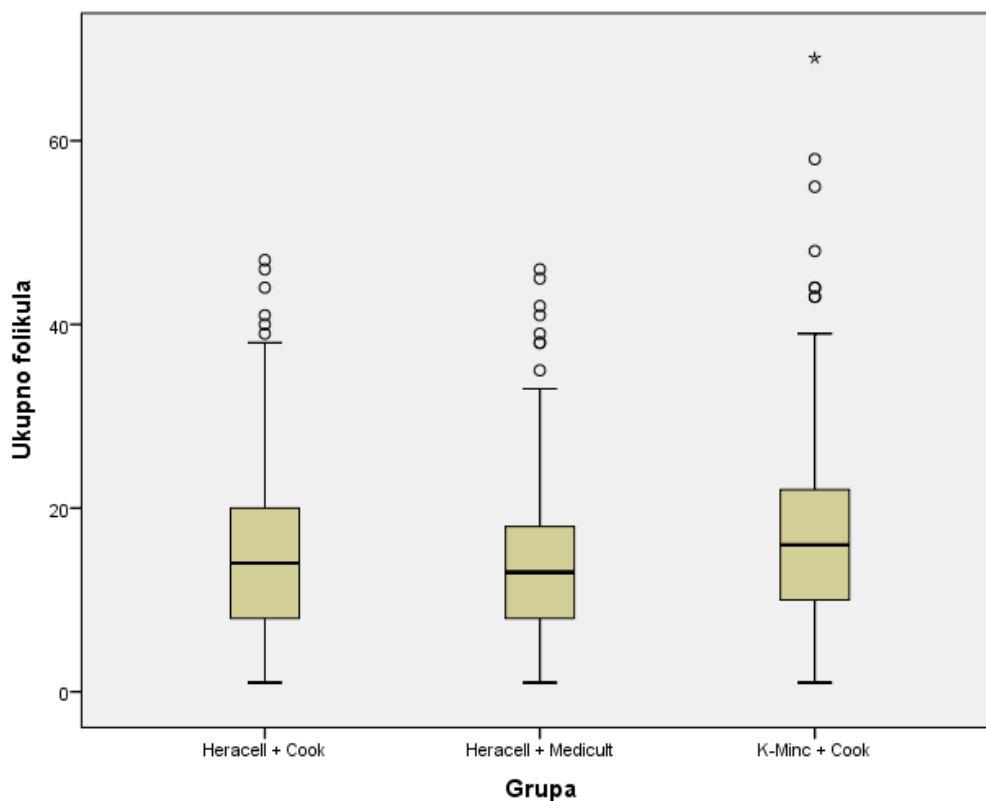
Deskriptivna statistika ukupnog broja folikula na dan završne injekcije po ispitivanim grupama je prikazana u tabeli 12.

Tabela 12. Ukupan broj folikula na dan završne injekcije

Grupa	N	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
Heracell + Cook	1130	14.55	7.79	14	1	47
Heracell + Medicult	692	13.62	7.47	13	1	46
K-Minc + Cook	663	16.67	9.21	16	1	69
Ukupno	2485	14.85	8.19	14	1	69

Evidentno je da je najveći broj folikula u trećoj grupi, dok je u drugoj grupi najmanji. Razlika između ispitivanih grupa je statistički značajna ($X^2=40,116$; $p<0,001$). Naknadnim poređenjima je utvrđeno da razlika značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult ($p=0,030$), između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$), kao i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$). Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 12).

Grafikon 12. Ukupan broj folikula na dan završne injekcije



4.2.6. Broj folikula većih od 17 mm na dan završne injekcije

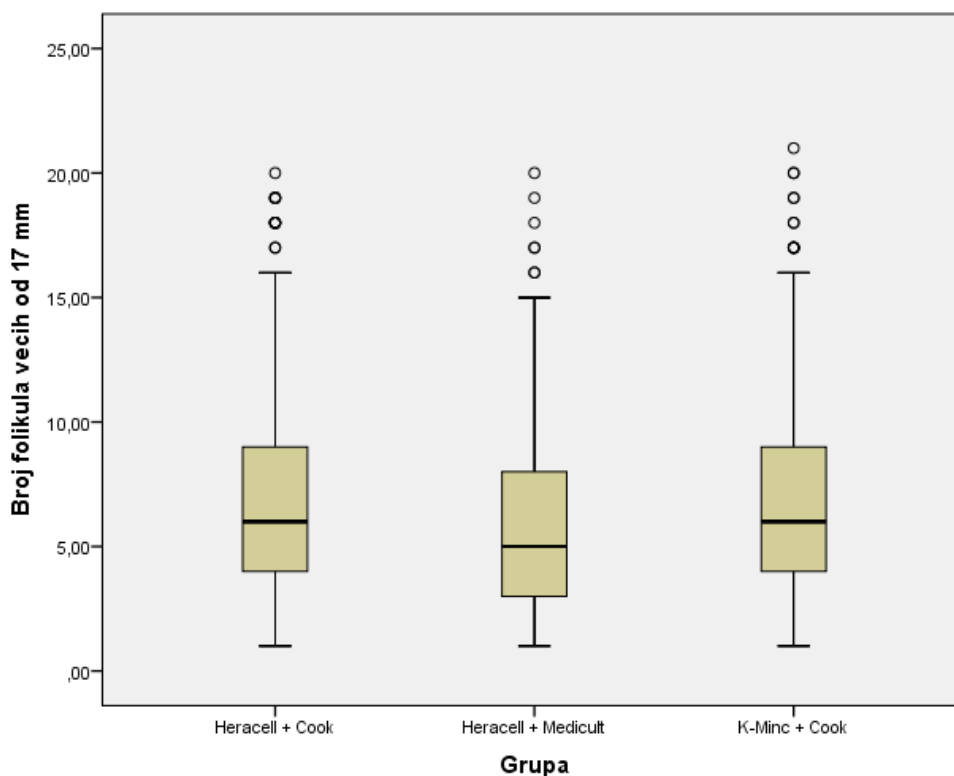
Deskriptivna statistika broja folikula koji su veći od 17 mm na dan završne injekcije, po ispitivanim grupama je prikazana u tabeli 13.

Tabela 13. Broj folikula većih od 17mm na dan završne injekcije

Grupa	A.S.	SD	Median	Minimum m	Maksimu m
Heracell + Cook	6,70	3,57	6	1	20
Heracell + Medicult	5,59	3,23	5	1	20
K-Minc + Cook	6,86	3,74	6	1	21
Ukupno	6,44	3,56	6	1	21

Kao i u prethodnoj analizi, najveći broj folikula je u trećoj grupi, dok je u drugoj najmanji. Razlika između ispitivanih grupa je statistički značajna ($X^2=50,192$; $p<0,001$). Naknadnim poređenjima je utvrđeno da razlika značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult ($p<0,001$), nema statistički značajne razlike između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook ($p=1,000$), a ima između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$). Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 13).

Grafikon 13. Broj folikula većih od 17mm na dan završne injekcije



4.2.7. Debljina endometrijuma na dan završne injekcije

Deskriptivna statistika debljine endometrijuma na dan završne injekcije u odnosu na ispitivane grupe je prikazana u tabeli 14.

Tabela 14. Debljina endometrijuma na dan završne injekcije

Grupa	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
Heracell + Cook	10.47	1.70	10.30	6.00	17.30
Heracell + Medicult	10.56	1.63	10.40	7.00	20.00
K-Minc + Cook	10.53	1.65	10.50	6.30	17.00
Ukupno	10.51	1.67	10.40	6.00	20.00

Kao što se vidi u tabeli prosečne vrednosti su vrlo slične, gotovo identične i utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između grupa ($F=0,687$; $p=0,503$).

4.2.8. Broj prikupljenih oocita, broj MII oocita i broj fertilizovanih oocita

Deskriptivna statistika broja prikupljenih oocita, MII oocita i broja fertilizovanih oocita je prikazana u tabeli 15.

Tabela 15. Prikupljeni oociti, MII oociti i fertilizovani oociti

	Grupa	A.S.	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	Rezultat testiranja
Broj prikupljenih oocita	Heracell + Cook	8.43	4.43	8	5	11	$X^2=26,491$ $p<0.001$
	Heracell + Medicult	7.90	4.72	7	4	11	
	K-Minc + Cook	8.79	4.16	8	6	11	
Broj MII oocita	Heracell + Medicult	6.43	3.74	6	4	8	$X^2=22,920$ $p<0.001$
	Heracell +	5.98	4.10	5	3	8	
	K-Minc + Cook	6.65	3.71	6	4	9	
Broj fertilizovanih oocita	Heracell + Cook	4.07	2.79	4	2	6	$X^2=90,276$ $p<0.001$
	Heracell + Medicult	3.37	2.66	3	1	5	
	K-Minc + Cook	4.77	3.01	4	3	7	

Iz tabele se vidi da je najveći broj prikupljenih oocita bio u trećoj grupi, kao i ukupan broj MII oocita i broj fertilizovanih oocita. Analizirajući ove podatke Kruskal-Wallis

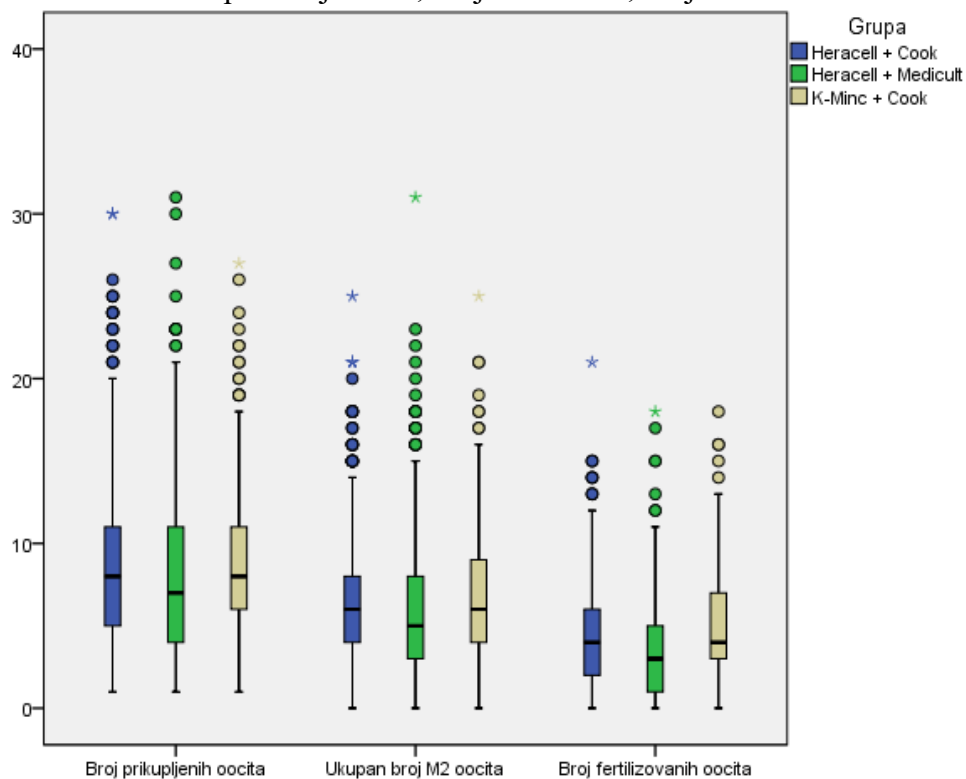
testom utvrđeno je da su razlike u sva tri ispitivana obeležja posmatranja statistički značajne.

Kada je u pitanju broj prikupljenih oocita, naknadnim poređenjima je utvrđeno da je razlika značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult ($p=0,001$), između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook razlika nije značajna ali je blizu konvencionalnog nivoa značajnost ($p=0,084$), a između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook razlika je značajna ($p<0,001$).

Kada je u pitanju broj MII oocita, naknadnim poređenjima je utvrđeno da je razlika značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult ($p=0,001$), između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook razlika nije značajna ($p=0,449$), a značajna je između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$).

Kada je u pitanju broj fertilizovanih oocita, naknadnim poređenjima je utvrđeno da je razlika značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult ($p<0,001$), između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$), kao i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$). Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 14).

Grafikon 14. Ukupan broj oocita, broj MII oocita, broj fertilizovanih oocita



4.2.9. Primenjeni način oplođenja jajnih ćelija

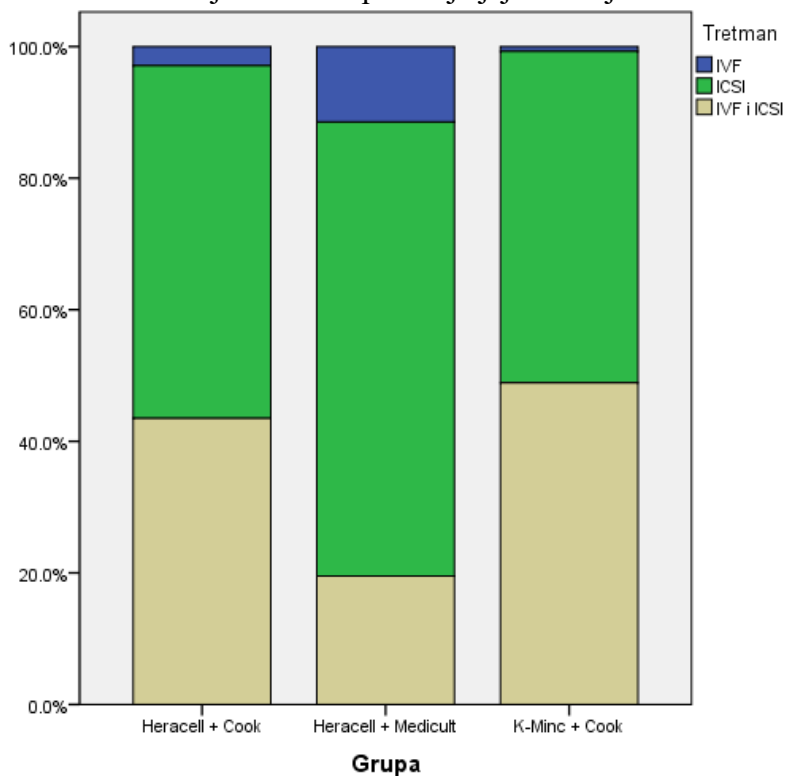
Distribucija pacijentkinja u odnosu na primenjeni način oplođenja jajnih ćelija je prikazana u tabeli 16.

Tabela 16. Primenjeni način oplođenja jajnih ćelija

		Primenjeni način oplođenja jajnih ćelija			Ukupno
		IVF	ICSI	IVF i ICSI	
Heracell + Cook	N	33	608	493	1134
	%	2.9%	53.6%	43.5%	100.0%
Heracell + Medicult	N	80	481	136	697
	%	11.5%	69.0%	19.5%	100.0%
K-Minc + Cook	N	5	336	326	667
	%	0.7%	50.4%	48.9%	100.0%
Ukupno	N	118	1425	955	2498
	%	4.7%	57.0%	38.2%	100.0%

Iz tabele se vidi da je procenat IVF najveći u drugoj grupi, procenat ICSI takođe, dok je kombinacija najčešća u trećoj grupi ($X^2=214,343$; $p<0,001$). Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 15).

Grafikon 15. Primenjeni način oplođenja jajnih ćelija



4.2.10. Ukupan broj embriona, broj visoko kvalitetnih embriona i udeo visoko kvalitetnih embriona u odnosu na MII oocite

Deskriptivna statistika ukupnog broja embriona, broj visoko kvalitetnih embriona i udeo visoko kvalitetnih embriona u odnosu na MII oocite je prikazana u tabeli 17.

Tabela 17. Ukupan broj embriona, broj visoko kvalitetnih embriona i udeo visoko kvalitetnih embriona u odnosu na MII oocite

	Grupa	A.S.	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	Rezultat testiranja
Ukupan broj embriona	Heracell + Cook	3.14	1.66	3	2	3	X ² =35.265 p<0.001
	Heracell + Medicult	3.01	1.74	3	2	3	
	K-Minc + Cook	2.77	1.37	3	2	3	
Broj top embriona	Heracell + Cook	2.63	1.97	3	1	3	X ² =19.407 p<0.001
	Heracell + Medicult	2.56	2.00	2	1	3	
	K-Minc + Cook	2.23	1.64	2	1	3	
Udeo top embriona u odnosu na MII	Heracell + Cook	.42	.29	.4	.2	.6	X ² =24.384 p<0.001
	Heracell + Medicult	.44	.29	.4	.3	.6	
	K-Minc + Cook	.36	.26	.3	.2	.5	

Iz tabele se vidi da je ukupan broj embriona, najveći u prvoj grupi, a najmanji u trećoj. Najveći broj visoko kvalitetnih embriona je bio takođe, u prvoj grupi, a najmanji u trećoj dok je udeo visoko kvalitetnih embriona u odnosu na MII oocite najveći u drugoj, ali gotovo identičan kao i u prvoj grupi pacijentkinja. Analizirajući ove podatke Kruskal-Wallis testom utvrđeno je da su razlike u sva tri ispitivana obeležja posmatranja statistički značajne.

Kada je u pitanju ukupan broj embriona, naknadnim poređenjima je utvrđeno da je razlika značajna nasamo granici statističke značajnosti između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult (p=0,052), ia značajna zmeđu Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook (p<0,001) i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook (p<0,001).

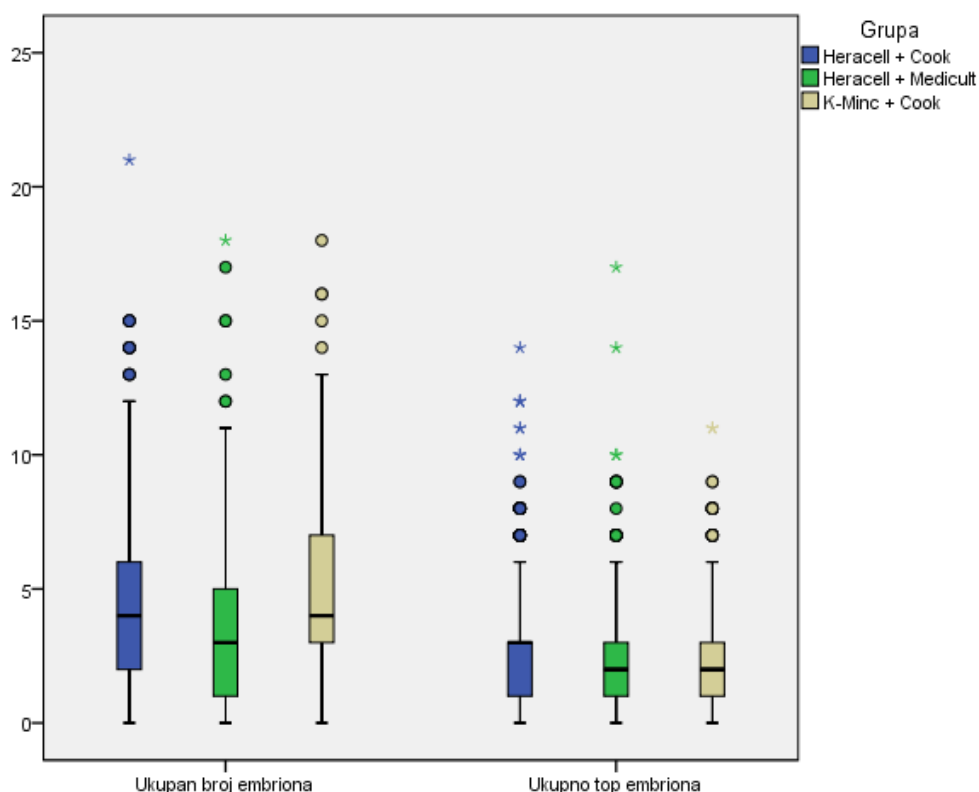
Kada je u pitanju broj visoko kvalitetnih embriona, naknadnim poređenjima je utvrđeno da razlika nije značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult (p=0,943), ali

je značajna između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook ($p < 0,001$), i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook ($p = 0,011$).

Kada je u pitanju udeo visoko kvalitetnih embriona u odnosu na MII oocite, naknadnim poređenjima je utvrđeno da razlika nije značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult ($p = 0,432$), ali je značajna između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook ($p < 0,001$), kao i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook ($p < 0,001$).

Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 16).

Grafikon 16. Ukupan broj embriona i broj visoko kvalitetnih embriona



4.2.11. Ispitivanje potencijalnih faktora koji utiču na broj visoko kvalitetnih embriona

U tabeli 18 prikazan je model sa brojem visoko kvalitetnih embriona kao zavisnom varijablom i ostalim faktorima kao nezavisnim. Zbog devijacije distribucije, varijabla ukupan broj visoko kvalitetnih embriona je transformisana logaritmovanjem i kao takva je ušla u model.

Rezultati su prikazani u tabeli 18.

Tabela 18. Faktori koji utiču na ukupan broj visoko kvalitetnih embriona

Prediktor	F	p vrednost	Parcijalna Eta ²
Grupa	6.350	.002	.006
Starost	2.613	.106	.001
ITM	.745	.388	.000
Pušenje	.027	.869	.000
Trajanje infertiliteta	7.281	.007	.004
Broj prethodnih VTO	.128	.721	.000
Tretman	4.401	.012	.004
Protokol	.042	.837	.000
Broj prikupljenih oocita	.094	.760	.000
Broj MII oocita	.035	.851	.000
Broj fertilizovanih oocita	168.011	<0.001	.079

Iz tabele se vidi da su značajni prediktori grupa (kombinacija inkubatora i medijuma), trajanje infertiliteta i broj fertilizovanih oocita,. Od svih navedenih faktora najveći uticaj broj fertilizovanih oocita. Grupa i trajanje infertiliteta imaju zanemarljivo mali uticaj u odnosu na ostale značajne prediktore.

4.2.12. Broj transferisanih embriona

Deskriptivna statistika broja transferisanih embriona je prikazana u tabeli 19.

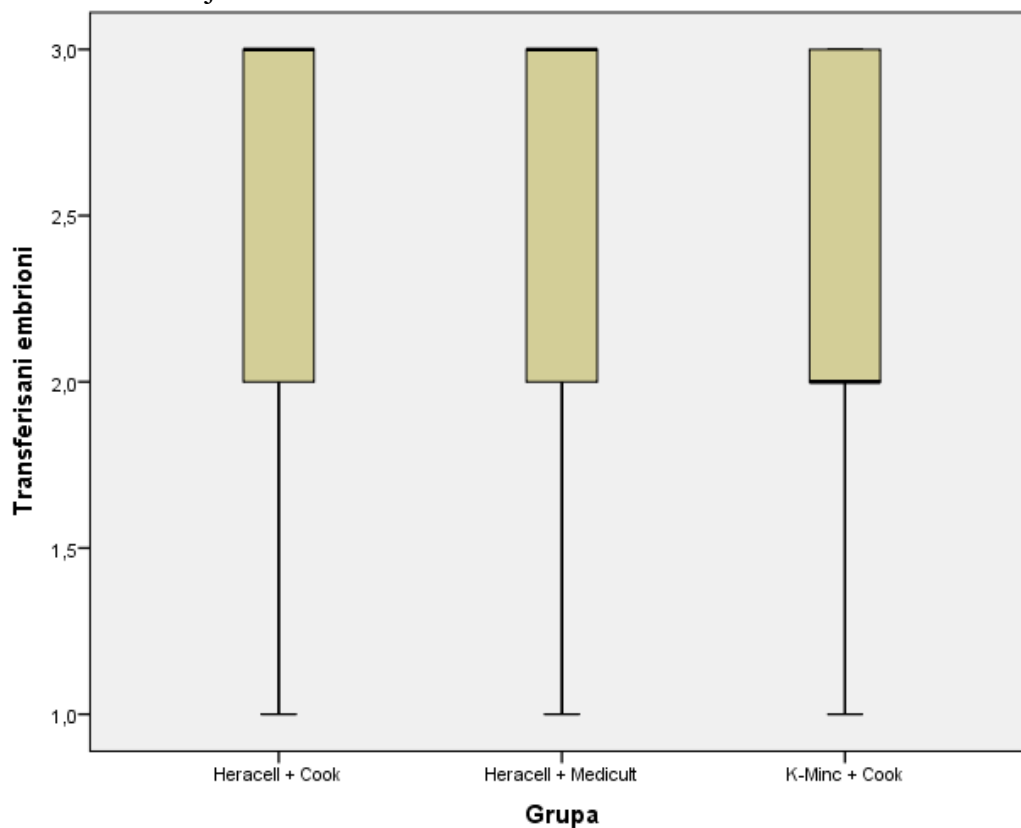
Tabela 19. Broj transferisanih embriona

Grupa	A.S.	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	Rezultat testiranja
Heracell + Cook	2.61	.67	3	2	3	X ² =81.162 p<0.001
Transferisan Heracell + i embrioni Medicult	2.48	.75	3	2	3	
K-Minc + Cook	2.36	.64	2	2	3	

Prosečan broj transferisanih embriona, kao i medijana, najveći je u grupi Heracell+Cook, a najmanji u K-Minc+Cook. Statističkom analizom je utvrđeno da je razlika između ove tri grupe statistički značajna. Naknadnim poređenjima je utvrđeno da je razlika značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult (p=0,003), između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook razlika je značajna (p<0,001), takođe, je

značajna i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook ($p < 0,001$). Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 17).

Grafikon 17. Broj transferisanih embriona



4.2.13. Embrio transfer

Distribucija pacijentkinja u odnosu na embrio transfer je prikazana u tabeli 20.

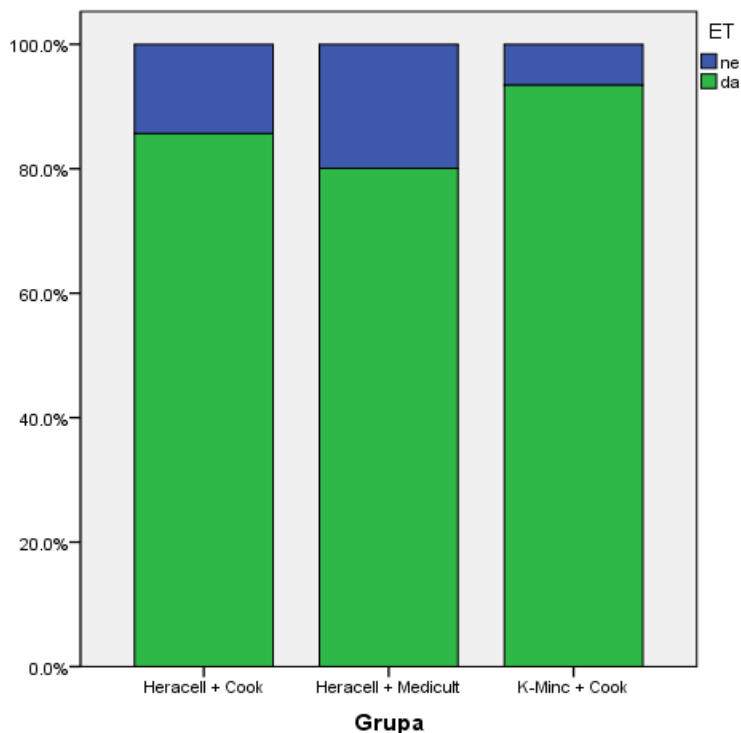
Tabela 20. Embriotransfer

		Embriotransfer		Ukupno
		ne	da	
Heracell + Cook	N	163	971	1134
	%	14.4%	85.6%	100.0%
Heracell + Medicult	N	139	558	697
	%	19.9%	80.1%	100.0%
K-Minc + Cook	N	44	623	667
	%	6.6%	93.4%	100.0%
Ukupno	N	346	2152	2498
	%	13.9%	86.1%	100.0%

Najveći procenat embriotransfera je u trećoj grupi, dok je najmanji u drugoj grupi. Statističkom analizom je utvrđeno da je ova razlika statistički značajna ($X^2=51,351$; $p<0,001$).

Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 18).

Grafikon 18. Embriotransfer



4.2.14. Dan embrio transfera

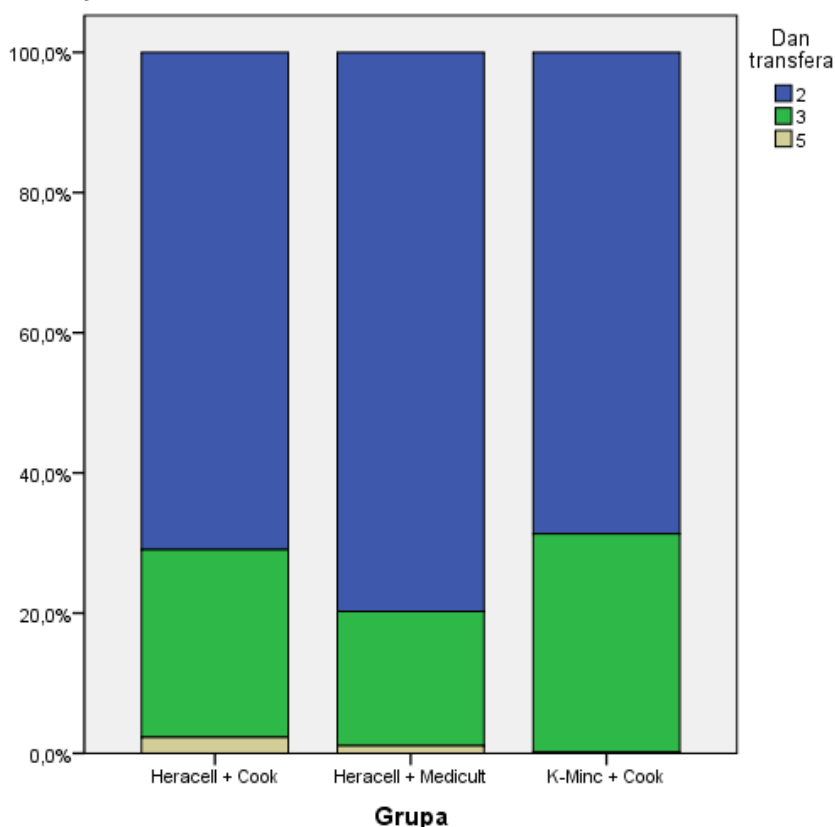
Distribucija pacijentkinja u odnosu na dan embrio transfera je prikazana u tabeli 21.

Tabela 21. Dan embrio transfera

		Dan embrio transfera			Ukupno
		2	3	5	
Heracell + Cook	N	689	260	22	971
	%	71,0%	26,8%	2,3%	100,0%
Grupa Heracell + Medicult	N	445	107	6	558
	%	79,7%	19,2%	1,1%	100,0%
K-Minc + Cook	N	428	194	1	623
	%	68,7%	31,1%	0,2%	100,0%
Ukupno	N	1562	561	29	2152
	%	72,6%	26,1%	1,3%	100,0%

Drugi dan embrio transfera je najčešće bio u drugoj grupi pacijentkinja, dok je treći dan embrio transfera bio u ostale dve grupe češći. Analizirajući ove rezultate hi-kvadrat testom uvrđeno je da je razlika između grupa statistički značajna ($X^2=34,993$; $p<0,001$). Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 19).

Grafikon 19. Dan embriotransfera



4.3. Ishodi vantelesnog oplodjenja

Ishodi vantelesnog oplodjenja kod pacijentkinja sa urađenim embriotransferom do 31.3.2015. godine

U tabeli 22. su prikazani ishodi trudnoće pacijentkinja kojima je embriotransfer urađen najranije devet meseci pre nego što su podaci sakupljeni.

Tabela 22. Ishodi vantelesnog oplodjenja

		Grupa						P vrednost
		Heracell + Cook		Heracell + Medicult		K-Minc + Cook		
		N	%	N	%	N	%	
Fertilizaciona stopa (x±sd)		0.69±0.29		0.67±0.28		0.74±0.23		<0.001
Biohemijska	ne	526	53.1%	342	61.3%	220	45.7%	<0.001
trudnoća	da	465	46.9%	216	38.7%	261	54.3%	
Klinicka trudnoća	ne	554	55.9%	360	64.5%	234	48.6%	<0.001
	da	437	44.1%	198	35.5%	247	51.4%	
Implantaciona stopa (x±sd)		0.50±0.23		0.49±0.23		0.58±0.26		<0.001
Uznappedovala	ne	602	60.7%	375	67.2%	259	53.8%	<0.001
trudnoća	da	389	39.3%	183	32.8%	222	46.2%	
Uznappedovala	1	268	68.9%	139	76.0%	159	71.6%	0.227
	2	99	25.4%	41	22.4%	56	25.2%	
	plodova	3	22	5.7%	3	1.6%	7	
Vanmaterična	ne	980	98.9%	557	99.8%	477	99.2%	0.139
	trudnoća	da	11	1.1%	1	0.2%	4	
Spontani pobačaj	ne	344	88.4%	167	91.3%	205	92.3%	0.252
	da	45	11.6%	16	8.7%	17	7.7%	
Prevrereni porođaj	ne	279	81.1%	139	83.2%	169	82.0%	0.840
	da	65	18.9%	28	16.8%	37	18.0%	
Broj porođaja	1	240	69.8%	129	77.2%	150	73.2%	0.228
	2	97	28.2%	36	21.6%	53	25.9%	
	3	7	2.0%	2	1.2%	2	1.0%	
Ukupno porođaja (n=716)		344	88.4%	167	91.3%	205	92.3%	0.252
Ukupan broj dece (n=924)		455		207		262		
Sopa živorođene dece		30.3%		24.0%		30.7%		0.005

Iz tabele se vidi da postoji značajna razlika u biohemijskim, kliničkim i uznapredovalim trudnoćama između ispitivanih grupa, kao i u stopi fertilizacije i implantacije. Naknadnim poređenjem je utvrđeno da u odnosu na stopu fertilizacije nema statistički značajne razlike između Heracell+Cook vs. Heracell+Medicult grupe ($p=0,647$), a postoji između Heracell+Cook vs. Kminc+Cook ($p<0,001$) i Heracell+Medicult vs. Kminc+Cook grupe ($p<0,001$).

Naknadnim poređenjem je utvrđeno da u odnosu na stopu biohemijskih trudnoća postoji statistički značajna razlika između Heracell+Cook vs. Heracell+Medicult grupe

($p=0,006$), a takođe, i između Heracell+Cook vs. Kminc+Cook ($p=0,024$) i Heracell+Medicult vs. Kminc+Cook grupe ($p<0,001$).

Naknadnim poređenjem je utvrđeno da u odnosu na stopu kliničkih trudnoća postoji statistički značajna razlika između Heracell+Cook vs. Heracell+Medicult grupe ($p=0,003$), a takođe, i između Heracell+Cook vs. Kminc+Cook ($p=0,027$) i Heracell+Medicult vs. Kminc+Cook grupe ($p<0,001$).

Naknadnim poređenjem je utvrđeno da u odnosu na stopu implantacije nema statistički značajne razlike između Heracell+Cook vs. Heracell+Medicult grupe ($p=1,000$), a postoji između Heracell+Cook vs. Kminc+Cook ($p<0,001$) i Heracell+Medicult vs. Kminc+Cook grupe ($p<0,001$).

Naknadnim poređenjem je utvrđeno da u odnosu na stopu uznapredovalih trudnoća postoji statistički značajna razlika između Heracell+Cook vs. Heracell+Medicult grupe ($p=0,033$), a takođe, i između Heracell+Cook vs. Kminc+Cook ($p=0,036$) i Heracell+Medicult vs. Kminc+Cook grupe ($p<0,001$).

Naravno, treba obratiti pažnju na smanjenje ukupnog broja jedinica posmatranja u tabeli koje je posledica toka trudnoće.

4.3.1. Logistički regresioni modeli sa kliničkom trudnoćom kao ishodom

Logistički regresioni modeli urađeni su sa ciljem da se utvrdi efekat inkubatora i medijuma kada se kontroliše za ostale faktore koji značajno utiču na ishod VTO.

U tabeli 23. prikazan je logistički regresioni model sa pacijentkinjama koje su u ciklusu veštačke oplodnje imale COOK medijum, pa se porede one koje su imale Heracell i Kminc inkubatore.

Tabela 23. Poređenje inkubatora sa COOK medijumom

	P vrednost	OR	95% IP za OR	
Kminc	,005	1,411	1,111	1,792
Starost	,022	,961	,929	,994
ITM	,267	,980	,944	1,016
Pušenje	,003	,577	,403	,825
Trajanje infertiliteta	,023	1,039	1,005	1,073
Broj prethodnih VTO	,010	,828	,717	,957
Tretman IVF+ ICSI	,338	1		
ICSI	,143	,541	,238	1,230
IVF	,962	,994	,783	1,262
Dug protokol	,145	1,213	,936	1,572
Broj prikupljenih oocita	,298	,970	,917	1,027
Ukupnan broj_M2 oocitia	,175	1,055	,977	1,139
Broj fertilizovanih oocita	,693	1,013	,949	1,083
Broj transferisanih embriona	<0,001	1,767	1,443	2,164
dan_transfera_ - 2	,528	1		
3	,812	1,029	,811	1,307
5	,276	,524	,164	1,677

Iz tabele se vidi da je šansa da dođe do kliničke trudnoće za 41% veća ukoliko se radi o K-Minc inkubatoru u odnosu na Heracell.

U narednom modelu uzete su samo pacijentkinje koje su u postupku vantelesnog oplodjenja imale Heracell inkubator a komparirani su medijumi (COOK i Medicult).

Tabela 24. Poređenje medijuma kod Heracell inkubatora

	P vrednost	OR	95% IP za OR	
COOK medijum	,002	1,528	1,174	1,988
Starost	,237	,978	,943	1,015
ITM	,258	,979	,943	1,016
Pušenje	,047	,713	,510	,996
Trajanje infertiliteta	,388	1,014	,982	1,047
Broj prethodnih VTO	,008	,830	,722	,954
Tretman IVF+ ICSI	,847	1		
ICSI	,970	1,010	,611	1,668
IVF	,572	1,081	,826	1,414
Dug protokol	,028	1,352	1,034	1,768
Broj prikupljenih oocita	,224	,967	,917	1,020
Ukupnan broj_M2 oocitia	,434	1,029	,957	1,107
Broj fertilizovanih oocita	,287	1,038	,969	1,113
Broj transferisanih embriona	<0,001	2,066	1,651	2,585
dan_transfera_ - 2	,289	1		
3	,240	1,173	,899	1,531
5	,331	,595	,208	1,697

Šansa da dođe do kliničke trudnoće je za 52% veća ukoliko se radi o COOK medijumu u odnosu na Medicult.

Poslednji model je model koji poredi sve tri kombinacije inkubatora i medijuma (tabela 25).

Tabela 25. Finalni model

	P vrednost	OR	95% IP za OR	
Heracell + COOK	<0,001	1		
Heracell + Medicult	,001	,648	,502	,836
Kminc + COOK	,003	1,422	1,126	1,796
Starost	,015	,964	,937	,993
ITM	,312	,984	,954	1,015
Pušenje	,022	,712	,532	,953
Trajanje infertiliteta	,120	1,022	,994	1,050
Broj prethodnih VTO	,003	,828	,731	,938
Tretman IVF+ ICSI	,955	1		
ICSI	,804	,941	,583	1,519
IVF	,907	1,013	,816	1,258
Dug protokol	,046	1,251	1,004	1,558
Broj prikupljenih oocita	,056	,956	,913	1,001
Ukupnan broj_M2 oocitia	,130	1,050	,986	1,117
Broj fertilizovanih oocita	,187	1,038	,982	1,097
Broj transferisanih embriona	<0,001	1,830	1,541	2,173
dan_transfera_ - 2	,402	1		
3	,919	,989	,799	1,225
5	,177	,493	,177	1,376

Na osnovu rezultata finalnog modela, jasno je da je najbolja kombinacija za kliničku trudnoću kao ishod K-Minc + Cook, I da je za 42% veća šansa da dođe do kliničke trudnoće u odnosu na Heracell + Cook, odnosno skoro dva puta veća šansa u odnosu na Heracell + Medicult.

4.3.2. Logistički regresioni modeli sa porođajem kao ishodom

Sledeći set logističkih regresionih modela urađen je sa ciljem da se utvrdi efekat inkubatora i medijuma kada se kontroliše za ostale fakotre koji značajno utiču na ishod VTO, a u ovom slučaju na porođaj.

U tabeli 26. prikazan je logistički regresioni modeli sa pacijentkinjama koje su u ciklusu veštačke oplodnje imale COOK medijum, pa se porede one koje su imale Heracell i Kminc inkubatore.

Tabela 26. Poređenje inkubatora sa COOK medijumom

	P vrednost	OR	95% IP za OR	
Kminc	.460	1.098	.857	1.407
Starost	.013	.957	.924	.991
ITM	.850	.996	.959	1.035
Pušenje	.090	.722	.496	1.052
Trajanje infertiliteta	.422	1.014	.980	1.049
Broj prethodnih VTO	<0.001	.723	.614	.852
Tretman IVF+ ICSI	.143			
ICSI	.058	.397	.152	1.032
IVF	.741	1.043	.814	1.335
Dug protokol	.037	1.330	1.018	1.737
Broj prikupljenih oocita	.086	.949	.894	1.007
Ukupnan broj_M2 oocitia	.021	1.099	1.014	1.190
Broj fertilizovanih oocita	.254	.961	.898	1.029
Broj transferisanih embriona	<0.001	1.878	1.511	2.335
dan_transfera_- 2	.635			
3	.883	1.019	.795	1.306
5	.351	.538	.147	1.978

Iz tabele se vidi da je šansa da se rodi dete za 9.8% veća ukoliko se radi o K-Minc inkubatoru u odnosu na Heracell i ova šansa nije statistički značajna.

U narednom modelu uzete su samo pacijentkinje koje su u postupku vantelesnog oplođenja imale Heracell inkubator a komparirani su medijumi (COOK i Medicult).

Tabela 27. Poređenje medijuma kod Heracell inkubatora

	P vrednost	OR	95% IP za OR	
COOK medijum	.011	1.420	1.083	1.862
Starost	.454	.986	.950	1.023
ITM	.276	.979	.943	1.017
Pušenje	.167	.784	.555	1.107
Trajanje infertiliteta	.731	1.006	.973	1.039
Broj prethodnih VTO	.000	.731	.625	.854
Tretman IVF+ ICSI	.407			
ICSI	.977	1.008	.601	1.690
IVF	.193	1.202	.911	1.585
Dug protokol	.012	1.428	1.083	1.883
Broj prikupljenih oocita	.094	.954	.903	1.008
Ukupnan broj_M2 oocita	.118	1.061	.985	1.143
Broj fertilizovanih oocita	.850	1.007	.938	1.081
Broj transferisanih embriona	.000	1.985	1.568	2.513
dan_transfera_- 2	.662			
3	.737	1.048	.797	1.379
5	.411	.621	.200	1.931

Šansa da žena rodi dete je 42% veća ukoliko se radi o COOK medijumu u odnosu na Medicult.

Poslednji model je model koji poredi sve tri kombinacije inkubatora i medijuma (tabela 28).

Tabela 28. Finalni model

	P vrednost	OR	95% IP za OR	
Heracell + COOK	.012			
Heracell + Medicult	.011	.711	.546	.924
Kminc + COOK	.446	1.098	.863	1.399
Starost	.022	.966	.937	.995
ITM	.740	.995	.963	1.027
Pušenje	.145	.798	.589	1.081
Trajanje infertiliteta	.575	1.008	.980	1.037
Broj prethodnih VTO	<0.001	.741	.645	.851
Tretman IVF+ ICSI	.757			
ICSI	.608	.878	.534	1.444
IVF	.672	1.050	.839	1.312
Dug protokol	.008	1.361	1.085	1.708
Broj prikupljenih oocita	.020	.944	.899	.991
Ukupnan broj_M2 oocitia	.023	1.079	1.011	1.151
Broj fertilizovanih oocita	.888	.996	.941	1.054
Broj transferisanih embriona	<0.001	1.860	1.549	2.232
dan_transfera_ - 2	.545			
3	.795	.971	.778	1.212
5	.279	.539	.176	1.650

Šansa da se rodi dete je manja za 28,9% ukoliko se radi o Heracell+Medicult u odnosu na Heracell+Cook i ova šansa je statistički značajna. Nasuprot tome, šansa da se rodi živo dete je 9,8% veća ukoliko se radi o Kminc+Cook u odnosu na Heracell+Cook i ova šansa nije statistički značajna.

4.4. Jednoplodne trudnoće završene u terminu porođaja

U daljoj analizi analizirane su pacijentkinje koje su praćene do kraja trudnoće i koje su imale jednoplodnu trudnoću koju su iznele sa minimum 37 nedelja gestacije.

Deskriptivna statistika pacijentkinja i njihovih partnera u odnosu na opšte karakteristike (starost, antropometrija i pušenje) je prikazana u tabeli 29.

Tabela 29. Opšte karakteristike

	Heracell + Cook (n=157)	Heracell + Medicult (n=87)	K-Minc + Cook (n=91)	p vrednost
Pacijentkinja				
Starost (godine)	33.0±3.35	32.2±2.9	33.2±3.7	0.088 ^a
Visina (cm)	168.5±5.7	167.1±6.0	168.8±5.6	0.110 ^a
Težina (kg)	65.2±8.6	63.9±9.5	63.7±5.6	0.351 ^a
BMI	22.95±2.77	22.86±3.15	22.36±2.58	0.272 ^a
BMI raspon	17.7-29.9	19.3-29.9	17.2-29.9	
Pušenje >10 cig/dnevno	12 (7.9%)	10 (11.6%)	5 (5.6%)	0.335 ^b
Partner				
Starost (godine)	36.2±4.8	35.6±4.8	35.5±4.8	0.494 ^a
Visina (cm)	181.7±7.8	180.8±7.2	182.4±6.5	0.435 ^a
Težina (kg)	88.8±13.3	87.4±13.6	90.3±12.6	0.406 ^a
BMI	25.5±6.4	24.3±7.9	25.5±6.6	0.470 ^a
Pušenje >10 cig/dnevno	45 (36.3%)	32 (43.2%)	23 (27.7%)	0.125 ^b

^a ANOVA ^b Hi-kvadrat

Iz tabele se vidi da su prosečne vrednosti kao i procenti vrlo slični u sve tri grupe, a statističkim testovima je utvrđeno da nema značajnih razlika između grupa po ispitivanim parametrima.

U daljoj analizi ispitivane su razlike po karakteristikama infertiliteta (tabela 30).

Tabela 30. Karakteristike infertiliteta

	Heracell + Cook (n=157)	Heracell + Medicult (n=87)	K-Minc + Cook (n=91)	p vrednost
Trajanje infert. (god.)	6.62±3.64	8.72±3.54	5.97±3.32	<0.001 ^c
Uzrok infertiliteta				
Nepoznato	27 (17.2%)	16 (18.4%)	29 (31.9%)	0.097 ^b
Ženški uzrok	55 (35%)	37 (42.5%)	28 (30.8%)	
Muški uzrok	40 (25.5%)	20 (23%)	16 (17.6%)	
Kombinovani	35 (22.3%)	14 (16.1%)	18 (19.8%)	
Broj prethodnih ciklusa				
0	108 (68.8%)	75 (86.2%)	70 (76.9%)	0.020 ^c
1	36 (22.9%)	4 (4.6%)	17 (18.7%)	
2	9 (5.7%)	6 (6.9%)	3 (3.3%)	
3	3 (1.9%)	1 (1.1%)	1 (1.1%)	
4+	1 (0.6%)	1 (1.1%)	0	
Infertilitet				
Primarni	123 (78.3%)	70 (80.5%)	76 (83.5%)	0.614 ^b
Sekundarni	34 (21.7%)	17 (19.5%)	15 (16.5%)	

^a ANOVA ^b Hi-kvadrat ^c Kruskal-Wallis

Za razliku od prethodne tabele, ovde postoje evidentne razlike između grupa. Naime, razlika je značajna po trajanju infertiliteta i broju prethodnih ciklusa. Trajanje

infertiliteta je u proseku najkraće u trećoj grupi, a najviše prethodnih pokušaja vantelesnog oplodjenja je bilo u prvoj grupi pacijentkinja

U sledećoj tabeli (Tabela 31) prikazana je deskriptivna i analitička statistika karakteristika VTO.

Tabela 31. Karakteristike VTO

	Heracell + Cook (n=157)	Heracell + Medicult (n=87)	K-Minc + Cook (n=91)	p vrednost
Broj dana stimulacije	9.49±1.16	9.24±1.28	9.86±1.43	0.005 ^a
Protokol stimulacije				
Kratak	80 (51.0%)	17 (19.5%)	47 (51.6%)	<0.001 ^b
Dug	77 (49.0%)	70 (80.5%)	44 (48.4%)	
Ukupna doza GnRH	2563.0±892.6	2723.8±1157.3	2364.5±762.6	0.187 ^c
E2	7030.4±2621.5	7271.8±2688.2	7416.5±2752.9	0.525 ^a
Ukupan br. folikula	15.31±6.53	15.06±2.76	17.71±7.87	0.034 ^c
Broj folikula ≥ 17	7.53±3.65	6.23±2.68	7.17±3.49	0.039 ^c
Endometr. debljina	10.82±1.82	10.74±1.54	10.61±1.51	0.642 ^a

^a ANOVA ^b Hi-kvadrat ^c Kruskal-Wallis

Značajne razlike između grupa su po pitanju broja dana stimulacije, protokolu stimulacije, ukupnom broju folikula i broju folikula koji su veći od 17 mm. Naime, prosečna vrednost dana stimulacije je najveća u trećoj a najmanja u drugoj grupi, dug protokol je daleko češći u drugoj grupi, dok je ukupan broj folikula u proseku najveći u trećoj grupi. Ali, prosečna vrednost broja folikula većih i jednakih 17 je značajno manja u drugoj grupi u odnosu na ostale dve.

U tabeli 32. prikazane su dodatne karakteristike VTO.

Tabela 32. Dodatne karakteristike VTO

	Heracell + Cook (n=157)	Heracell + Medicult (n=87)	K-Minc + Cook (n=91)	p vrednost
Ukupan broj oocita	9.03±3.74	8.84±4.41	9.62±3.79	0.196 ^c
MII oociti	7.01±3.22	6.99±3.66	7.76±3.41	0.122 ^c
Način oplodjenja				
IVF	1 (0.6%)	14 (16.1%)	0	
ICSI	83 (52.9%)	57 (65.5%)	35 (38.5%)	<0.001 ^b
IVF/ICSI	73 (46.5%)	16 (18.4%)	56 (61.5%)	
Stopa fertilizacije	68±29	66±27	71±20	0.177 ^c
Broj embriona	4.52±2.25	4.38±2.27	5.51±2.79	0.008 ^c
Top kvalitet embrioni	2.61±1.75	2.86±1.73	2.53±1.76	0.278 ^c
Transferisani embrioni	2.71±0.54	2.61±0.65	2.38±0.53	<0.001 ^a
ET dan 2	112 (71.3%)	73 (83.9%)	65 (71.4%)	
ET dan 3	45 (28.7%)	14 (16.1%)	26 (28.6%)	0.069 ^b

^a ANOVA ^b Hi-kvadrat ^c Kruskal-Wallis

Razlike su značajne u distribuciji načina oplodjenja jajnih ćelija, broja embriona i broja transferisanih embriona. Naime, prosečan broj embriona je najveći u trećoj grupi, kao i transferisani embrioni, dok su ostale dve grupe vrlo slične. Broj transferisanih embriona je najmanji u trećoj grupi dok je vrlo sličan u ostale dve. Dan embriotransfera ima značajnost vrlo blizu konvencionalnog nivoa značajnosti.

U tabeli 33. prikazane su karakteristike novorođenčadi po ispitivanim grupama.

Tabela 33. Karakteristike novorođenčadi

	Heracell + Cook (n=157)	Heracell + Medicult (n=87)	K-Minc + Cook (n=91)	p vrednost
Telesna težina(g)	3290.4±406.0	3280.0±416.5	3292.2±425.9	0.977 ^a
Niska telesna težina (<2500g)	6 (3.8%)	2 (2.3)	0	0.169 ^b
Normalna (2500-4500g)	151 (96.2%)	85 (97.7%)	91 (100%)	
Dužina (cm)	51.04±2.17	51.36±2.36	51.35±2.34	0.485 ^a
Muško	74 (47.1%)	46 (52.9%)	41 (45.1%)	0.551 ^b
Telesna težina (g)	3371.5±444.9	3304.3±449.7	3350.0±403.7	0.714 ^a
Niska telesna težina(<2500g)	2 (2.7%)	2 (4.3%)	0	0.590 ^b
Normalna (2500-4500g)	72 (97.3%)	44 (95.7%)	41 (100%)	
Dužina (cm)	51.35±2.37	51.54±2.55	51.83±2.29	0.703 ^a
Žensko	83 (52.9%)	41 (47.1%)	50 (54.9%)	0.603 ^b
Telesna težina (g)	3218.1±355.3	3252.7±379.3	3244.8±441.6	0.872 ^a
Niska telesna težina(<2500g)	4 (4.8%)	0	0	0.125 ^b
Normalna (2500-4500g)	79 (95.2%)	41 (100%)	50 (100%)	
Dužina (cm)	50.77±1.94	51.18±2.17	50.96±2.33	0.619 ^a

^a ANOVA ^b Hi-kvadrat ^c Kruskal-Wallis

Iz tabele se jasno vidi da nema značajnih razlika između ispitivanih grupa po telesnoj masi i telesnoj dužini kod jednoplodnih trudnoća koje su završene u terminu porođaja.

4.4.1. Generalizovani linearni model sa telesnom težinom novorođenčeta

Generalizovani linearni model sa telesnom težinom novorođenčeta kao zavisnom i prediktorima koji su se značajno razlikovali između grupa u univarijantnoj analizi je prikazan u tabeli 34

Tabela 34. Telesna težina novorođenčeta

Parametar	B	SE	p vrednost	Parcijalna Eta ²
Odsečak	3444,472	234,802	,000	,402
Heracell+Cook	-16,343	56,705	,773	,000
Heracell+Medicult	-47,464	70,655	,502	,001
K-Minc+Cook	0 ^a			
Kratki protokol	11,113	48,957	,821	,000
Dugi protokol	0 ^a			
Dan transfera 2	-55,343	52,980	,297	,003
Dan transfera 3+	0 ^a			
Trajanje infertiliteta	12,221	6,609	,065	,011
Broj prethodnih VTO	92,260	34,057	,007	,022
Trajanje stimulacije	-11,102	18,942	,558	,001
Broj folikula 17+	-6,207	7,601	,415	,002
Broj transferisanih emb.	-23,947	41,953	,569	,001

^aReferentna grupa

Iz modela se vidi da grupa, odnosno vrsta medijuma i vrsta inkubatora nema statistički značajan uticaj na telesnu masu novorođenčadi. Zapravo, gotovo nijedan prediktor u ovoj analizi nije značajan (osim prethodnih VTO).

5. DISKUSIJA

U ovoj studiji analizirane su dve vrste medijuma i dve vrste inkubatora, odnosno njihove kombinacije (Heracell + Cook, Heracell + Medicult i K-Minc + Cook) i njihov uticaj na ishod vantelesnog oplođenja, na telesnu težinu i dužinu terminske dece iz jednoplodnih trudnoća.

Starost pacijentkinja je jedan od najvažnijih faktora povezanih sa uspehom vantelesnog oplođenja. Zapravo, kvalitet jajnih ćelija je direktno povezan sa godinama života pacijentkinja i što su žene starije kvalitet jajnih ćelija je lošiji i njihova sposobnost da dovedu do nastanka visokokvalitetnih embriona sposobnih da daju zdravu trudnoću je manja (70). Analizirajući starost pacijentkinja u našim ispitivanim grupama utvrdili smo da je prosečna starost vrlo slična u sve tri grupe pacijentkinja. Ali obzirom da se radi o velikim uzorcima i malim standardnim devijacijama, razlika između grupa je statistički značajna i prosečna starost pacijentkinja je bila najveća u K-Minc-Cook grupi pacijentkinja ($33,95 \pm 3,96$.god), a najmanja u Heracell + Medicult grupi ($32,64 \pm 3,17$), dok je u Heracell + Cook bila $33,42 \pm 3,86$ godina. Naknadnim poređenjima je utvrđeno da je razlika značajna među grupama.

Kod gojaznih žena bez obzira na način zatrudnivanja (prirodno ili postupcima asistirane reprodukcije) je utvrđeno da je smanjen procenat živorođene dece, s jedne strane zbog toga što je smanjena stopa zatrudnivanja, a sa druge strane zato što je povećan procenat spontanih pobačaja kao i povećana učestalost komplikacija u trudnoći (71). Prosečna vrednost indeksa telesne mase u našoj studiji je bila vrlo sličana u sve tri grupe i bila je unutar normalnih vrednosti, s tim što se zbog veličine uzorka ipak statistički značajno razlikovala između Heracell + Cook i K-Minc + Cook kao i između Heracell + Medicult i K-Minc + Cook grupe, a nije se razlikovala između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult grupe. Prosečna vrednost indeksa telesne mase je bila najmanja u K-Minc + Cook grupi pacijentkinja. U nekoliko studija je uočeno da je rizik od infertiliteta tri puta veći u populaciji gojaznih žena nego kod normalno uhranjenih žena i to bez obzira da li se radi o spontanom zatrudnivanju ili pokušaju zatrudnivanja primenom asistiranih reproduktivnih tehnologija (72, 73, 74). Pokazano je, da se šansa da ostanu u drugom stanju, smanjuje za po 5% po povećanju BMI za 1, kod žena sa

vrednosti BMI od 29 kg/m² pa nadalje (75) .

Poznato je da cigarete sadrže toksične hemikalije, koje imaju mutagena i kancerogena dejstva (76). Pušenje smanjuje fertilitet i produžava trajanje infertiliteta. Takođe, Pineles BL i sar. su u svojoj studiji pokazali da pušenje prouzrokuje povećan rizik od poremećaja menstrualnog ciklusa, smanjenja ovarijalne rezerve sa povećanjem serumskog AMH, kao i povećanja incidence pobačaja (77). Pokazano je da je i uspeh IVF-a manji kod pušača, pa je u studiji Lintsen AM i sar. u grupi pacijentkinja koje su pušile procenat porođaja bio manji za 7,3% (78). U našim ispitivanim grupama postojala je statistički značajna razlika u pušačkom statusu, tako da je najviše pušača bilo u Heracell-Medicult grupi (16,4%), a najmanje u K-Minc-Cook grupi (9,3%).

Prosečno trajanje infertiliteta, u našim ispitivanim grupama je bilo najduže u grupi Heracell + Medicult (8,76 god), a najkraće u grupi K-Minc + Cook (5,89 god.), što se može objasniti i većom dostupnošću postupka vantelesnog oplođenja u okviru nacionalnog programa i bržim upućivanjem pacijentkinja na proceduru VTO u periodu kada se koristio K-Minc + Cook. Takođe je i indeks telesne mase, kao i zastupljenost pušača u Heracell + Medicult bila najveća što može imati veze sa dužim trajanjem infertiliteta. Studije su pokazale da je potrebno duže vremena da žene zatrudne, bilo sponatno ili metodama asistirane reprodukcije, ukoliko su gojazne, uključujući tu i one gojazne žene koje imaju regularne cikluse (79).

Sekundarni infertilitet načešći u Heracell + Cook (26,8%) grupi pacijentkinja, dok su Heracell-Medicult (19,9%) i K-Minc-Cook (21,3%) grupa veoma slične. Analizom indikacija za vantelesno oplođenje utvrđeno je da je ženski uzrok infertiliteta najčešće bio zastupljen u Heracell-Medicult grupi (34,3%), muški i kombinovani infertilitet u Heracell + Cook grupi (28,4% i 28,6%) pacijentkinja, a nepoznat (idiopatski) infertilitet u K-Minc-Cook grupi pacijentkinja (20,8%).

Bitno je naglasiti da se procenat trudnoća u prvom pokušaju i kumulativni procenat trudnoća razlikuju i da je za procenu uspeha IVF-a, bitno analizirati da li je i koliko bilo prethodnih pokušaja IVF-a kod pacijentkinja. U studiji Malizia BA i sar. kumulativni procenat trudnoća, na 6000 pacijentkinja u toku 6 IVF ciklusa, je bio između 51% i 72% (80). Takođe je utvrđeno, da su pacijentkinje koje se nisu vraćale na

ponovni IVF posle neuspešnog IVF pokušaja imale slabiju prognozu da zatrudne od onih koje su ponavljale IVF tretmane posle neuspelih IVF procedura. Naravno, treba imati u vidu fiziološki pad u fertilitetu sa starenjem pacijentkinja, koji je prisutan kako u opštoj populaciji, tako i u populaciji sa smanjenim fertilitetom, tako da se kumulativni procenat trudnoća smanjuje sa starošću pacijentkinja (80). U našim ispitivanim grupama utvrđeno je da su pacijentkinje Heracell + Cook grupe imale najveći procenat prethodnih VTO (36,1%), a da su pacijentkinje Heracell-Medicult grupe imale najmanje (23,4%).

Primenjeni protokol za kontrolisanu ovarijalnu hiperstimulaciju i optimalna doza gonadotropina zavise od godina starosti pacijentkinja, njihovog hormonskog statusa, ovarijalne rezerve kao i od odgovora pacijentkinje u eventualnim prethodnim pokušajima IVF-a (6). Najčešće je dug protokol primenjivan u Heracell-Medicult grupi (75,5%) jer su one bile najmlađe i imale su najmanji broj prethodnih VTO, dok je najređe primenjivan u K-Minc-Cook (38,2%) grupi pacijentkinja, koje su bile u proseku najstarije i imale više prethodnih pokušaja VTO.

Prosečna dužina stimulacije u K-Minc-Cook grupi pacijentkinja je bila najduža ($9,96 \pm 1,536$) dana, u Heracell + Cook grupi ($9,55 \pm 1,281$ dana), a najkraća je bila Heracell-Medicult grupi ($9,17 \pm 1,259$). Prosečna potrošnja gonadotropina bila je najmanja u K-Minc-Cook grupi ($2442,8 \pm 791,3$ i.j.) a najveća u Heracell-Medicult grupi ($2849,9 \pm 1216,6$) iako bi bilo za očekivanje da u K-Minc-Cook grupi pacijentkinja i dužina stimulacije i utrošak gonadotropina bude najveći, obzirom na najveću prosečnu starost pacijentkinja ove grupe. Međutim, najveća prosečna potrošnja gonadotropina je zapravo bila u grupi pacijentkinja u kojoj je bio najveći prosečni indeks telesne mase. Maheshwari i sar. su analizom 37 studija utvrdili potrebu za većim dozama gonadotropina u postupcima IVF-a kod gojaznih žena (81). Međutim, u studijama Spandorfer SD i saradnika a potom i u najnovijoj studiji Ozekinci M i saradnika količina ordiniranih gonadotropina bila je komparabilna (82, 83). Potreba za povišenim dozama gonadotropina kod gojaznih pacijentkinja, isto tako može biti povezana i sa absorpcijom, distribucijom i klirensom ovih lekova u ekscesivnom masnom tkivu (84). Takođe, su i Apinkar F. i saradnici pokazali povećane potrebe za ukupnom dozom gonadotropina sa porastom BMI, uz dobijen manji broj jajnih ćelija (85).

Prosečna vrednost estradiola na dan aplikacije završne injekcije nije se

razlikovala u našim ispitivanim grupama pacijentkinja, ali je najniža prosečnu vrednost estradiola bila u Heracell-Medicult grupi u kojoj je i BMI bio najveći. Souter I. i saradnici su utvrdili da je BMI u negativnoj korelaciji sa nivoom estradiola preovulatornih folikula, odnosno da su niže vrednosti estradiola povezane sa povišenim vrednostima BMI i naši rezultati su u skladu sa ovim zapažanjem (84). A takođe, je u skladu sa studijama koje su pokazale da su pacijenti sa prekomernom težinom imali signifikantno niži nivo estradiola u krvi (82, 86). Imudia AN i sar. su u svojoj retrospektivnoj kohortnoj studiji utvrdili da VTO pacijenti sa visokim pikom estradiola na dan završne injekcije češće rađaju decu sa niskom telesnom težinom za dob, od pacijentkinja sa nižim pikom estradiola (87).

Uloga endometrijuma u uspehu IVF-a je od ogromnog značaja. Utvrđeno je da debljina endometrijuma može imati protektivni efekat na rađanje dece sa niskom telesnom težinom, ističući na taj način ulogu endometrijuma na rast fetusa i perinatalni ishod nakon vantelesnog oplođenja (87, 88). Takođe, je utvrđeno da je poželjna debljina endometrijuma od 7-14 mm i da ta debljina daje najveću šansu da dođe do kliničke trudnoće i rođenja deteta (89, 90, 91), mada je u literaturi opisana i trudnoća sa endometrijumom od 4 mm (92). U ovoj studiji poređenjem debljine endometrijuma na dan aplikacije završne injekcije nije utvrđeno postojanje razlike u ispitivanim grupama pacijentkinja i u sve tri grupe pacijentkinja debljina endometrijuma je bila zadovoljavajuća, odnosno preko 10 mm.

Evidentno je da je najveći ukupan broj folikula u K-Minc + Cook grupi (16,67±9,21), dok je u Heracell + Medicult grupi najmanji (13,62±7,47). Takođe, je i prosečan broj folikula većih od 17 mm najveći u K-Minc + Cook grupi (6,86±3,74), a najmanji u Heracell + Medicult grupi (5,59±3,23). Iako je bilo za očekivanje da se najmanji broj folikula i folikula većih od 17 mm dobije u grupi pacijentkinja koje su bile najstarija, mi smo najmanji broj folikula i folikula većih od 17 mm imali u grupi pacijentkinja sa najvećim prosečnim BMI. Poznato je da gojaznost uzrokuje infertilitet na različite načine uključujući poremećaj razvoja folikula, tj. utiče i na kvalitativni i na kvantitativni razvoj folikula, potom na fertilizaciju, razvoj embriona kao i na implantaciju (93). Studije su su pokazale da kod gojaznih pacijentkinja postoji potreba za većim dozama gonadotropina praćena sa izostankom adekvatnog rasta folikula (82, 94, 95, 96). Takodje su uočili, da je kod gojaznih pacijentkinja bila smanjena intrafolikularna koncentracija humanog horionskog gonadotropina, smanjen pik

estradiola, uz smanjen broj jajnih ćelija dobijenih aspiracijom. Dobijene jajne ćelije su bile lošijeg kvaliteta, bio je smanjen broj zrelih oocita, dobijeni embrioni su bili lošijeg kvaliteta, bio je smanjen procenat embriotransfera i smanjen broj transferisanih embriona (82, 94, 95, 96). Takođe su, Matalliotakis I. i sar. koji su podelili grupe BMI $\leq 24 \text{ kg/m}^2$ i BMI $> 24 \text{ kg/m}^2$ kao i Esinler I i sar., dobili manji broj jajnih ćelija kod pacijentkinja sa prekomernom težinom, dok su Dechaud H. i sar., Farhi J. i sar. i Ozekinci M. i sar. u svojim studijama dobili komparabilan broj jajnih ćelija (97, 86, 98, 99, 83).

U ovoj studiji najveći broj prikupljenih oocita je bio u K-Minc + Cook ($8,79 \pm 4,16$), a najmanji u Heracell + Medicult grupi ($7,9 \pm 4,72$), što je bilo i očekivano obzirom na ukupan broj dobijenih folikula. Naknadnim poređenjima, kada je u pitanju broj prikupljenih oocita, utvrđeno je da je razlika značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult, dok razlika u broju prikupljenih oocita između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook nije značajna, ali je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti ($p=0,084$) i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook razlika je bila značajna.

Kada je u pitanju broj MII oocita, takođe, je taj broj bio najveći K-Minc + Cook ($6,65 \pm 3,71$), a najmanji u Heracell + Medicult grupi ($5,98 \pm 4,1$). Naknadnim poređenjima je utvrđeno da je razlika značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult, između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook razlika nije značajna ($p=0,449$), a značajna je između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook.

U odnosu na primenjeni način oplođenja jajnih ćelija, odnosno da li je primenjen konvencionalni IVF, ICSI ili i IVF i ICSI metod utvrdili smo da je procenat IVF najčešći u Heracell + Medicult grupi (11,5%), procenat ICSI takođe (69,0%), dok je kombinacija najčešća u K-Minc + Cook grupi (48,9%). Izbor načina oplođenja jajnih ćelija zavisio je od udela muškog infertiliteta. U Heracell + Medicult grupi je učestalost ženskog infertiliteta bila najviše zastupljena, pa je zato i klasičan IVF najčešće primenjivan.

Broj fertilizovanih oocita bio je najveći u K-Minc + Cook grupi ($4,77 \pm 3,01$), potom u Heracell + Cook grupi ($4,07 \pm 2,79$) a najmanji u Heracell + Medicult grupi ($3,37 \pm 2,66$). Kada je u pitanju broj fertilizovanih oocita, naknadnim poređenjima je utvrđeno da je razlika značajna između sve tri grupe, što je moglo i da se očekuje obzirom da je identična razlika postojala i po broju dobijenih oocita i MII oocita.

Međutim, najveći ukupan broj embriona je bio u Heracell + Cook grupi ($3,14 \pm 1,66$), a najmanji u K-Minc + Cook ($2,77 \pm 1,37$). Takođe je, i najveći broj top embriona je bio u Heracell + Cook grupi ($2,63 \pm 1,97$), a najmanji u K-Minc + Cook ($2,77 \pm 1,37$), dok je udeo top embriona u odnosu na MII oocite najveći u Heracell + Medicult grupi (44%). Naknadnim poređenjem utvrđeno je da su razlike, kada je u pitanju ukupan broj embriona, na samoj granici statističke značajnosti između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult ($p=0,052$), a značajna je između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook. Kada je u pitanju broj top embriona, naknadnim poređenjima je utvrđeno da razlika nije značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult ($p=0,943$), ali je značajna između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook. Kada smo analizirali udeo top embriona u odnosu na MII oocite, naknadnim poređenjima je utvrđeno da razlika nije značajna između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult ($p=0,432$), ali je značajna između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook kao i između Heracell + Medicult vs. K-Minc + Cook. Ovakvi rezultati nisu iznenađenje. Iako je najveći broj MII oocita, fertilizovanih oocita bio u našoj trećoj grupi (K-Minc + Cook) pacijentkinja u toj grupi smo dobili najmanje embriona i visokokvalitetnih embriona, što ukazuje na činjenicu da iako su ćelije bile zrele i oplodile se da je najverovatnije kvalitet jajnih ćelija bio lošiji, jer su te pacijentkinje ujedno bile najstarije (100). Ova činjenica se najviše ogleda u odnosu broja visokokvalitetnih embriona i MII ćelija koji je bio najbolji u drugoj grupi (Heracell + Medicult) pacijentkinja, koje su ujedno bile i najmlađe.

Svaka zemlja ima svoju zakonsku regulativu po pitanju broja embriona koji mogu da budu transferisani. Skandinavske zemlje su po tom pitanju najrestriktivnije. Po našem zakonu maksimalan broj embriona koji može da se ubaci tokom embriotransfera je tri. Smanjenje broja transferisanih embriona ima za cilj da se smanji broj višeplođnih trudnoća, zbog poznatih brojnih komplikacija povezanih sa višeplođnim trudnoćama. U Evropi se kod 24.2% pacijentkinja radi embrio transfer sa jednim embrionom, kod 57.7% pacijentkinja embrio transfer se radi sa 2 embriona, kod 16.9% pacijentkinja embrio transfer se radi sa 3 embriona a kod 1.2% pacijentkinja embrio transfer se radi sa 4 embriona (101). Prosečan broj transferisanih embriona, najveći je u grupi Heracell+Cook ($2,61 \pm 0,67$), a najmanji u K-Minc+Cook grupi ($2,36 \pm 0,64$), dok je u

Heracell+Medicult grupi ($2,48 \pm 0,75$). U K-Minc+Cook grupi prosečan broj transferisanih embriona je bio namanji, jer smo u našem svakodnom radu do 2014 godine transferisali po 3 embriona kod pacijentkinja svih starosnih kategorija, a od 2014.g. do danas, kada je bilo najviše pacijentkinja iz K-Minc+Cook grupe, pacijentkinjama do 36. godine života transferisali po 2 embriona, a nakon 36. godine po 3 embriona, jer smo želeli da smanjimo broj višeplođnih trudnoća. Tako da se rezultati dobijeni u našoj studiji, koji se odnose na broj transferisanih embriona, uklapaju u Evropsku statistiku.

Analizirajući procenat embriotransfera koje je bio uradjen u naše tri ispitivane grupe utvrdili smo da procenat embriotransfera bio najveći u K-Minc+Cook grupi (93,4%), u Heracell + Cook grupi (85,6%), dok je najmanji procenat embriotransfera bio u Heracell + Medicult grupi (80,1%) i ova razlika je bila statistički značajna.

Kada je u pitanju dan embrio transfera po doktrini rada našeg odeljenja embrio transfer smo najčešće radili drugi ili treći dan od aspiracije jajnih ćelija, a do 5.dana smo kultivisali embrione čiji kvalitet nije bio odgovarajući na dan 2 i 3, kako bi videli da li će se oni nastaviti razvoj do stadijuma blastociste i kog kvaliteta će biti eventualno dobijene blastociste. Ukoliko su oni dostigli stadijum blastociste i bili su adekvatni za embriotransfer, ET je i uradjen. Analizirajući podatke vezane za dan embrio transfera među ispitivanim grupama utvrdili smo da je najviše embrio transfera 2. dan bilo u Heracell + Medicult grupi (79,7,1%), treći dan embriotransfera je bio najčešće zastupljen u K-Minc+Cook grupi (31,1%), a 5. dan smo embrio transfer najčešće radili u Heracell + Cook grupi (2,3%). Analizirajući ove rezultate hi-kvadrat testom uvrđeno je da je razlika između grupa statistički značajna ($X^2=34,993$; $p<0,001$).

Ishod procedure vantelesnog oplođenja visoko je zavisna od mnogih faktora. Pod tim faktorima se podrazumevaju karakteristike pacijenata, karakteristike opreme za IVF laboratoriju, uslovi za kulturu tkiva, vrste medijuma i vrste kulture embriona. Kada su u pitanju karakteristike pacijenata značajne su godine života pacijentkinja (102, 103), protokol stimulacije jajnika (104), debljina endometrijuma (89,90), selekcija spermatozoida (105) i brojni drugi faktori. Izbor opreme za IVF laboratoriju je jako važan, jer on omogućuje da se obezbede adekvatni uslovi za kulturu embriona kao što je pH unutar kulture (106), koncentracija O_2 u inkubatorima (107), koncentracija CO_2 u

inkubatorima (18), temperatura unutar inkubatora (17), pojedinačna ili grupna kultura embriona (108, 109), ali je veoma važan i potrošni materijal koji se koristi u toku rada sa gametima i embrionima, a predviđen je za jednokratnu upotrebu (110). Gore nabrojani faktori u međusobnom sadejstvu omogućavaju nastanak visoko kvalitetnih embriona za embrio transfer, koji su potom sposobni da daju normalnu trudnoću, koja rezultuje rođenjem zdravog deteta u terminu porođaja.

Poslednja decenija je donela brojne napretke i inovacije vezane za tehnologije VTO. Tako da se u kliničkoj praksi u svetu i kod nas koriste novi tipovi medijuma i inkubatora i njihov uticaj na gamete, nastanak i razvoj embriona je predmet interesovanja mnogih naučnika. Cilj svakog centra koji se bavi vantelesnim oplođenjem je da odabere odgovarajući sistem kulture tkiva koji daje najbolje rezultate i u tom smislu smo i mi u našem svakodnevnom radu, prateći najnovija saznanja menjali medijume za kulturu embriona i vrste inkubatora i u ovoj disertaciji ih analizirali.

Po našem saznanju ni jedna studija na ovako sveobuhvatan način, (uključujući karakteristike pacijenata, karakteristike procedure, ishode trudnoća i uticaj na telesnu težinu i dužinu novorođenčadi), a uzimajući u obzir i isključujuće faktore, nije analizirala ove dve vrste medijuma i inkubatora.

Ne postoji jedinstven stav o efikasnosti različitih komercijalno dostupnih medijuma na ishod VTO, odnosno njihov uticaj na kvalitet embriona, stopu trudnoća i implantacije. I dok jedni smatraju da te razlike ne postoje (111, 112, 113), drugi pak smatraju da postoje razlike medju različitim komercijalno dostupnim medijumima kada je u pitanju kvalitet embriona (114, 115, 116). U ovoj disertaciji poredeći ishode trudnoća kada smo koristili dva različita medijuma za kulturu embriona u istoj vrsti inkubatora (Heracell) od kojih je Cook medijum bio sekvencijalni, a Medicult nije sekvencijalni utvrdili smo da ne postoji statistički značajna razlika u stopi fertilizacije i stopi implantacije, dok postoji značajna razlika u stopi kliničkih trudnoća, stopi uznapredovalih trudnoća i u stopi živorođene dece, te da se sekvencijalni medijum pokazao kao bolji. Nekoliko studija je ispitivalo efekte ISM1 i G-1TM v5 medijuma na kvalitet embriona i stopu implantacije. Morfologija embriona drugog i trećeg dana je bila signifikantno bolja kada su kultivisani u GIII medijumu, nego u ISM1 (112). Druga studija je pokazala da G1.2/G2.2 medijum bolji od Sydney IVF medijuma kada su embrioni transferisani 3.

dan, dok su bili podjednako efikasni kada su embrioni transferisani u stadijumu blastociste (114). Ranija studija je pokazala statistički značajno veću stopu trudnoća i stopu kliničkih trudnoća u Vitrolife medijumu u odnosu na Cook medijum (117). Nasuprot tome, druge studije su pokazale da ne postoji signifikantna razlika u kvalitetu embriona, stopi trudnoća i implantacionoj stopi između Irvine Scientific i IVF-50 Scandinavian IVF Science medijuma (112), Vitrolife i Medicult medijuma (113), kao i Earle's medijuma i komercijalno dostupnog Menezo B2 medijuma (111). Mi smo dobili statistički značajno manji broj visoko kvalitetnih embriona u Cook grupi, ali su te pacijentkinje ujedno bile starije od pacijentkinja gde je korišćen Medicult medijum, dok su drugi autori pokazali razliku u kvalitetu embriona na dan 3 sugerišući superiornost medijuma u odnosu na kvalitet embriona (Cleavage medijum i HTF) (115), G1.2/G2.2 i Sydney IVF cleavage/blastocyst medijum (114). Fechtali i sar. su pokazali da je kvalitet embriona 2. dana bio bolji u ISM1 kulturi, nego u FertiCult medijumu, čak i kada razlika u stopi trudnoća i implantacije nije postojala. Druga studija je pokazala da ISM1 medijum unapređuje embrionalni rast i razvoj, kao i procenat trudnoća (118).

U ovoj disertaciji nije dobijena statistički značajnu razliku u stopi vanmateričnih trudnoća, stopi pobačaja, prevremenih porođaja i terminskih porođaja između poređenih grupa. Međutim, Lin S i sar. su analizom 23.481 ciklusa VTO, kada su koristili tri različita medijuma (G5, G5 Plus, Global) utvrdili postojanje ekstrauterino gaviditeta kod 364 pacijentkinje. Njihova učestalost u odnosu na kliničke trudnoće je bila 3.01% u G5 grupi, 3.89% u G5 Plus grupi i 4.04% u Global grupi. Oni su utvrdili da je učestalost vanmateričnih trudnoća povezana sa vrstom korišćenog medijuma (119). Dok su Santos-Ribeiro S. i sar. u dvanaestogodišnjoj nacionalnoj analizi Velike Britanije, koja je obuhvatala 160000 trudnoća nastalih IVF procedurama, pokazala da im je incidenca ektopičnih trudnoća bila 1,4% (120). U našim analiziranim grupama bilo je ukupno 16 vanmateričnih trudnoća i njihova učestalost po grupama je bila 1,1%, 0,2% i 0,8% i nije bila statistički značajna, niti je mogla da se poveže sa vrstom korišćenog medijuma. Podaci iz literature govore da procenat pobačaja posle IVF procedura varira u rasponu od 9 -33% (101). Naši dobijeni rezultati su u skladu sa tim podacima i iako ne postoji statistički značajna razlika najmanji procenat pobačaja je bio u našoj trećoj grupi pacijentkinja.

Helmerhorst FM i sar. su utvrdili da kod jednoplodnih trudnoća nakon VTO u odnosu

na trudnoće nastale nakon prirodne koncepcije postoji relativni rizik 2.04 (1.80 to 2.32) za prevremene porođaje (< 37 nedelja) (51). Takođe, je utvrdio da je učestalost prevremenog porođaja (< 37 nedelja) 5.8-15% kod pacijentkinja nakon VTO, a 1.4-10.5%, kod pacijentkinja koje su prirodno zatrudnele (51). Učestalost prevremenog porođaja u našim ispitivanim grupama je bio od 16,8 - 18,9% i nije postojala značana razlika između ispitivanih grupa. U Evropi je prosečan broj porođaja po aspiracijama oko 19,3% (101).

Eksperimentalne studije kod brojnih sisara su utvrdile da koncentracija kiseonika u uterusu i tubama varira od 2 - 8% (121, 122, 123, 124, 125). Utvrđeno je da niske koncentracije kiseonika mogu unaprediti razvoj embriona kod nekoliko vrsta životinja kao što su: miševi (126, 127, 128, 129, 130), pacovi (131), hrčci (132), zečevi (133), svinje (134), koze (135), ovce (136, 137) i goveda (136, 138). Utvrđeno je da ukoliko se kultura mišjih embriona obavlja na niskim koncentracijama kiseonika, embrioni u tom slučaju imaju manji procenat aneuploidija (139). Pod pretpostavkom, da i u ženskom reproduktivnom traktu postoji fiziološka hipoksija, ova saznanja mogu imati veliki klinički značaj na vantelesnu oplodnju kod ljudi. Iako je utvrđeno da su u tubama i uterusu kod većine sisara koncentracija kiseonika niske, još uvek se u mnogim laboratorijama koriste inkubatori sa atmosferskim koncentracijama kiseonika (20%). Te povišene, nefiziološke koncentracije kiseonika mogu u kulturi embriona da dovedu do oslobađanja slobodnih radikala i na taj način da izazovu oksidativni stres kod embriona i da dovedu do poremećaja u razvoju embriona i razvoj visoke stope fragmentacija unutar embriona (140, 141).

Kada smo u ovoj disertaciji poredili ishode trudnoća koristeći isti medijum (Cook) a dve različite vrste inkubatora dobili smo da postoji statistički značajna razlika kako u stopi fertilizacije, tako i u stopi kliničkih trudnoća, implantacionoj stopi, stopi uznapredovalih trudnoća i u stopi živorođene dece, te da se K-Minc inkubator pokazao kao superiorniji. Razlika između dva korišćena inkubatora je zapravo u koncentraciji kiseonika koja se koristi za kulturu embriona pri čemu Heracell inkubator radi sa 20% O₂, dok K-Minc koristi gotovu smešu gasova u kojoj je koncentracija O₂ 5%.

I kao što je uočeno u studijama na životinjama, tako je i na ljudskim studijama

utvrđen pozitivan efekat niskih koncentracija kiseonika i na stopu embrionalnog razvoja do stadijuma blastociste, bržu deobu, povećanu stopu blastulacije, povećan broj ćelija blastociste i broja zamrznutih blastocisti i povećanog broja visokokvalitetnih blastocisti (107, 142, 143, 144, 145). Kada su u pitanju klinički ishodi nakon primene niskih koncentracija kiseonika u poređenju sa konvencionalnim inkubatorima koji rade na atmosferskim koncentracijama kiseonika neke studije su utvrdile veću stopu implantacije, trudnoća, porođaja i živorođene dece (145, 146, 147), dok druge studije nisu utvrdile postojanje pozitivnih efekata primene niskih koncentracija kiseonika na implantacionu stopu i stopu trudnoća (107, 142, 148, 149).

Tako su Kasterstein E. i sar. kada su podelili oocite svake pacijentkinje na inkubatore sa 5% i 20% kiseonika i upoređivali stopu fertilizacije, kvalitet embriona, stopu implantacije, trudnoća i živorođene dece utvrdili da se stopa fertilizacije nije razlikovala između ispitivanih grupa, ali je u 5 % O₂ grupi postojala statistički značajna razlika u visokokvalitetnim embrionima na dan 3 i razvio se veći broj embriona adekvatnih za embriotransfer (150). Stopa implantacija, stopa trudnoća, a takodje i stopa živorođene dece su bile statistički značajno veće u grupi sa 5% kiseonikom (150). Nasuprot gore navedenim rezultatima, Dumoulin i sar. poredeći rezultate kulture humanih oocita i embriona u prvih 2 ili 3 dana razvoja, koristeći atmosferske ili redukovane koncentracije kiseonika, nisu utvrdili postojanje razlike u stopi fertilizacije, razvoju embriona u 2 i 3 danu, stopi trudnoća i implantacije, ali su utvrdili statistički značajnu razliku u procentu nastalih blastocisti i 5 i 6 dan, te su stoga zaključili da niske koncentracije kiseonika verovatno imaju uticaja na kasnije faze razvoja embriona (142). Bahçeci i sar. su utvrdili, da kod pacijenata kojima je rađen ICSI, ne postoji razlika u kliničkim ishodima u zavisnosti od koncentracije kiseonika i zaključili su da atmosferske koncentracije kiseonika nemaju štetan uticaj na razvoj embriona u prvih 2 ili 3 dana kulture embriona i da nemaju štetan uticaj na klinički ishod (149). U studiji Kea i sar., je utvrđeno da različite koncentracije kiseonika nemaju efekta na stopu fertilizacije i formiranje blastociste kao ni na stopu trudnoća, ali da različite koncentracije kiseonika imaju uticaja na srednji skor embriona 3. dana (148).

Kovacic i sar., su u svojoj studiji analizirali efekte 5% i 20% koncentracija kiseonika na produženi razvoj embriona i utvrdili su da niske koncentracije kiseonika nemaju uticaja na fertilizaciju, ali su u poređenju sa 20% kiseonika ustanovili da je postojala statistički

značajna razlika u broju optimalnih embriona 3 dana razvoja i u IVF i u ICSI grupi (143). Takođe su utvrdili, da je kada se kultura radi na niskim koncentracijama kiseonika, veća šansa za razvoj optimalne blastociste 5.dan razvoja i to 2,1 put kod IVF-a a 1,7 puta kod ICSI-a.

Ciray i sar., su u svojoj studiji pokazali da su niske koncentracije kiseonika poboljšale ukupan broj blastocisti, a takodje i kvalitet embriona i 3. i 5. dana kulture (144). Meintjes i sar., su u svojoj studiji pokazali da embrioni kultivisani na niskim koncentracijama kiseonika imaju veću stopu implantacije nego embrioni kultivisani na atmosferskim koncentracijama kiseonika, kao i da je ukoliko su embrioni kultivisani na niskim koncentracijama kiseonika potom dali više živorođene dece nego embrioni kultivisani na atmosferskim koncentracijama kiseonika (147).

Kovacic i sar., su u svojoj studiji pokazali da je na niskim koncentracijama kiseonika postignut veći procenat kvalitetnih embriona na dan 2 i dan 5 kulture, dok je procenat uznapredovalih trudnoća i stopa implantacije bio sličan u obe grupe pacijenata tj. i kod pacijenata gde su korišćeni atmosferske ili redukovane koncentracije kiseonika. Oni su zaključili da su niske koncentracije kiseonika korisne za razvoj embriona bez obzira na dužinu kulture embriona (107).

Sem koncentracija kiseonika kao mogućeg uzroka za bolje rezultate uočene u ovoj disertaciji i sama konstrukcija inkubatora može imati uticaj na ishod IVF-a, što je i pokazala studija Fujiwara M i sar. čija studija je pokazala da je u mini inkubatorima sa vratima na gore, nakon otvaranja vrata u trajanju od 5 sekundi, vreme neophodno za oporavak temperature i u komori i u posudi bilo 5 min, dok je kod konvencionalnih inkubatora sa vratima napred, nakon otvaranja vrata u trajanju od 5 sekundi, bilo potrebno 20 min da se oporavi temperatura u komori koja je nakon otvaranja vrata brzo pala na 36.4°C, a u posudi je bilo potrebno 30 min da se oporavi temperatura koja je bila pala na 36.7°C (151). Razlika, u vremenu potrebnom da se oporavi koncentracija kiseonika posle otvaranja vrata između mini i konvencionalnih inkubatora, takodje je bila velika. Za oporavak koncentracije kiseonika posle otvaranja vrata u mini inkubatorima je bilo potrebno 3.0 ± 0 min, za razliku od konvencionalnih inkubatora kojima je trebalo za oporavak koncentracije kiseonika posle otvaranja vrata 7.8 ± 0.9 min. Mini inkubatori su se pokazali superiornijim u odnosu na konvencionalne inkubatore u oporavaku uslova unutar inkubatora i kulture tkiva nakon otvaranja i

zatvaranja vrata inkubatora. Razlog za to je što kod konvencionalnih inkubatora dolazi do velike razmene vazduha tokom otvaranja vrata i postoji i dodatno ubacivanje rashlađenog gasa iz gasnog cilindra neophodnog za oporavak koncentracije gasova unutar inkubatora. Maksimalna razlika temperature u ovoj studiji je bila 0.6°C, ali može se pretpostaviti da je u svakodnevnom radu u IVF laboratoriji ta razlika i veća, pošto se vrata češće otvaraju zbog kontrole kulture i promene medijuma, posebno ako se ima veći broj pacijenata ili ukoliko se dobije veći broj jajnih ćelija kod jedne pacijentkinje, a to može uticati na ishod kulture embriona. Klinički rezultati su pokazali da je stopa dobrih embriona statistički značajno bila veća u mini inkubatorima (151, 152). Sa željom da se još više unaprede rezultati IVF-a, poslednjih godina u upotrebu se uvode embrioscopi koji omogućavaju kontinuirano praćenje deobe embriona. Shodno tome očekivano je da upotreba embrioscopa smanji ove nepoželjne varijacije temperature. Ipak, nije pronađena statistički značajna razlika u svim analiziranim parametrima između embrioscopa i standardnih inkubatora, embrioskop omogućava samo morfološke, prostorne i vremenske analize embrionalnog razvoja (153). Anifandis G. i sar. ističu da jedan od razloga za ovakve preliminarne rezultate može biti činjenica da je embrio transfer rađen 2. ili 3. dana i smatraju da ukoliko bi umesto toga embrio transfer bio rađen 5. ili 6. dana da bi možda uspeh IVF-a bio znatno manji (154). Takođe su značajni rezultati Park H. i sar., čija studija je pokazala da nije bilo statistički značajne razlike u prosečnom broju embriona dobrog kvaliteta, kao ni u broju embriona sa 4 ćelije, implantacionoj stopi, stopi trudnoća i uznapredovalih trudnoća između time lapse inkubatora (embrioscopa) i konvencionalnih inkubatora, dok je stopa pobačaja bila veća u grupi gde je korišćen time lapse inkubatora (155).

Činjenica da je veća stopa živorođene dece ukoliko su transferisani embrioni na dan 5 nakon kulture pri niskim koncentracijama kiseonika nego kada su transferisani embrioni iste starosti koji su kultivisani na atmosferskim koncentracijama kiseonika u konvencionalnim inkubatorima, govori u prilog stanovištu da atmosferske koncentracije kiseonika negativno utiču na kasnije stadijume razvoja embriona, tako što utiču na metabolizam embriona i razvoj blastociste. Studija Calzi F. i sar. je dokazala hipotezu da niske koncentracije kiseonika mogu poboljšati ishod IVF-a kod embriona koji su transferisani na dan 2, dok to nije uočeno kod embriona iz ICSI-ja. Za konvencionalni

IVF i stopa fertilizacije i procenat dobijenih embriona je bio statistički značajno bolji pri niskim koncentracijama kiseonika nego pri atmosferskim koncentracijama (156).

Potencijalni štetni efekat slobodnih kiseoničkih radikala na kulturu embriona može se prevazići dodavanjem antioksidanasa u medijume ili smanjivanem koncentracije kiseonika u inkubatorima (147). Racionalnije je sprečiti natanak štetnih slobodnih radikala u samom embrionu i u njegovoj okolini kultivacijom embriona u sredini redukovanog O₂, nego pokušavati da se već nastali slobodni radikali neutrališu različitim agensima (146). U prilog tome da je korisnije koristiti redukovan kisenik nego antioksidanse u kulturi medijuma je i saznanje da mehanizam kojim kiseonik u većim koncentracijama može da prouzrokuje štetne efekte na embrion kao što je povećana ekspresija gena, nije moguće prevenirati samo dodavanjem antioksidansa u kulturu medijuma, što je pokazano na animalnim modelu (157).

Od kada je 1978. godine rođena prva “ beba iz epruvete” primena arteficialnih reproduktivih tehnologija je u stalnom porastu, sa približno 1-4% porođaja godišnje nakon vantelesnog oplođenja u razvijenim zemljama sveta (2). Poslednjih godina raste zabrinutost za bezbednost procedura ART i njihovog potencijalnog uticaja na zdravlje dece. Trudnoće iz IVF-a su povezane sa povećanim rizikom od prevremenog porođaja, rađanja dece sa niskom telesnom težinom, kongenitalnim anomalijama, perinatalnim mortalitetom, kao i drugih komplikacija vezanih za trudnoću (158, 159, 160, 161, 162, 163). Glavni razlog lošijeg neonatalnog ishoda trudnoća iz ART procedura je uglavnom nepoznat i najverovatnije je potencijalno multifaktorijalno uslovljen. U literaturi je opisano da ovarijalna stimulacija može uticati na kvalitet jajnih ćelija i receptivnost endometrijuma (164, 165), dok in vitro kultura može imati direktan uticaj na razvoj embriona (166, 167, 168, 169, 170). Nasuprot tome, drugi autori su mišljenja, da su za lošiji perinatalni rezultat procedura IVF-a odgovorne karakteristike pacijenata kao što su tip i dužina trajanja infertiliteta kao i sami uzroci subfertilnosti pacijenata a ne faktori koji su povezani sa samom procedurom IVF-a (171).

Formulacija medijuma kao i kontrolisani laboratorijski uslovi su od krucijalnog značaja za razvoj humanih embriona (31, 32, 33). Međutim na tržištu su dostupne različite vrste medijuma, sa različitim sastavom i malo je poznato koji su potencijalni kratkoročni i

dugoročni efekti različitih sastojaka medijuma na razvijajući embrion. Studije na životinjama su ukazale da promene u telesnoj težini potomstva mogu biti uzrokovane sastojcima medijuma (67, 68, 69, 172). Komplikacija, kao što je niska telesna težina dece, u humanoj populaciji može da predstavlja predispoziciju za rano ispoljavanje bolesti odraslih, kao što su tip 2 dijabetes (56), hipertenzija (57) i kardio-vaskularne bolesti (58, 59). Premda, ova udruženost nije u potpunosti razjašnjena, povećan rizik od niske telesne težine na rođenju kod dece iz vantelesnog oplođenja je uglavnom povezana sa visokom stopom višeplođnih trudnoća nakon ART procedura. Kako god, u humanom IVF-u se još uvek malo zna o mogućim efektima vrste medijuma na telesnu težinu dece.

Do sada je ograničen broj komercijalno dostupnih medijuma u tom smislu ispitivan, a dobijeni rezultati su kontraverzni. Dumoulin i sar., Nelissen i sar., Wuder i sar. i Kleijkers i sar. su poredili Vitrolife i Cook medijum (117, 173, 174, 175). Hassani i sar., su sproveli studiju poredeći Medicult and Vitrolife medium (176), dok su Eskild i sar., poredili Medicult Universal IVF, Medicult ISM1 i Vitrolife G-I PLUS (177). Ove studije su pokazale da vrsta korišćenog medijuma ima statistički značajan efekat na rani razvoj embriona, fetalni razvoj, kao i na telesnu težinu na rođenju. Štaviše, Eaton i sar. (2012), su poredili GL3, Global i GL5 medium (168), Vergouw i sar. HTV i Sage (167), Lin i sar. GSTM, Global i Quinn's advantage (169), Carrasco i sar., MediCult, Cook i Vitrolife (178), Zhu i sar. (2014) Vitrolife, Global i Quinns (170), Lemmen i sar. su poredili Cook and Medicult (179) i konačno Gu i sar. sproveli poređenje između SAGE i Vitrolife (180). Nasuprot prethodnoj grupi ove studije su pokazale da nema signifikantne povezanosti između vrste korišćenog medijuma i telesne težine na rođenju.

U pokušaju da analiziramo efekte komercijalno dostupnih medijuma na telesnu težinu novorođenčadi mi smo poredili novorođenčad rođenu nakon embrio transfera embriona nastalih u kulturi Cook i Medicult medijuma. Prema našem saznanju ova dva medijuma su upoređivana jedino u studiji Carrasco i sar. i Lemmen i sar., ali su se naši uključujući kriterijumi za analizu novorođenčadi iz jednoplođnih trudnoća razlikovali (178, 179). Zato smo mi postavili za cilj, da nastavimo već publikovana istraživanja i da svojim

proučavanjem doprinesemo boljem razumevanju i rasvetljavanju efekata medijuma za kulturu embriona koji su u širokoj upotrebi.

Ova studija je pokazala da tip medijuma za kulturu embriona nema statistički značajan efekat na prosečnu telesnu težinu i dužinu dece iz jednoplodnih terminskih trudnoća, nastalih nakon procedure IVF-ICSI.

Prema našem saznanju ovo je prva analiza u kojoj su poređeni Cook i Medicult medijumi, sa decom rođenom u terminu porođaja, na ovako homogenoj grupi pacijenata, kada su isključeni svi za trudnoću vezani faktori, a koji mogu uticati na telesnu težinu novorođenčadi (svi oblici šećerne bolesti, povišen arterijski pritisak, gestoze, intrauterini zastoje u rastu ploda, nestajući blizanci).

Sugerisano je da deca iz jednoplodnih trudnoća nasalih nakon ART procedura imaju povećan rizik od lošeg neonatalnog ishoda, kao što je niska telesna težina novorođenčadi na rođenju i prevremeni porođaj (51, 181, 182, 183). Zbog toga je telesna težina novorođenčadi na rođenju najčešće korišćen parameter za procenu perinatalnog ishoda, a koji je povezan morbiditetom i mortalitetom. (184).

Do danas je objavljeno jedanaest radova, od strane deset autora koji su ispitivali efekte medijuma za kulturu embriona na telesnu težinu novorođenčadi (185), od kojih su četiri analizirali i telesnu dužinu novorođenčadi (169, 179, 176, 174). Pet studija je pokazalo da vrsta medijuma ima statistički značajan uticaj na rani embrionalni razvoj i sledstveno tome i fetalni razvoj, kao i na telesnu težinu novorođenčadi iz IVF-a (117, 173, 176, 177, 170). Još specifičnije, oni su pokazali da su embrioni kultivisani u Vitrolife sekvencijalnom medijumu (GI.3) dali signifikantno težu decu na rođenju u odnosu na novorođenčad čiji su embrioni kultivisani u Cook sekvencijalnom medijumu (117) (173). Štaviše Eskild i sar., su pokazali iste rezultate kada u poredili Medicult universal, Medicult ISM I i Vitrolife GI.5 (177), slično Hassaniju i sar., kada su poredili Medicult ISM I i Vitrolife GI.5 (176), i Zhu i sar., kada su poredili Vitrolife GI.5 i Vitrolife GI.5 plus (170). Nasuprot tome, u našoj studiji nije uočena statistički značajna razlika u telesnoj težini i dužini novorođenčadi čija je kultura embriona obavljena u Cook ili Medicult medijumu. Naši rezultati su u korelaciji sa rezultatima Eaton-a i sar., a koji je utvrdio da nema efekta na telesnu težinu novorođenčadi kada je poredio Global medijum ili GI.3 medium (Vitrolife) ili GI.5 medium (Vitrolife) (168). Štaviše,

Vergouw i sar., su objavili iste rezultate za HTF i Sage[®] medijume za kulturu embriona (167). U studiji u kojoj su poređena novorođenčad čiji su embrioni kultivisani u GI.5 (Vitrolife) ili Global ili Quinn's advantage medijumu (Sage) je utvrđeno da vrsta medijuma nema uticaj na srednju vrednost telesne težine i srednju vrednost telesne dužine novorođenčadi (169). Carrasco i sar., su svoje rezultate dobili poredeći u prospektivnoj studiji Vitrolife GI.3 medijum i Cook K-SICM, a u retrospektivnoj studiji Medicult ISM I i Cook K-SICM i Vitrolife GI.3 medijum (178), dok je Wunder i sar. poredio Vitrolife i Cook K-SICM medijume i dobili su iste rezultate (174). Jedino su Lemmen i sar. (2014) poredili istu vrstu medijuma kao u našoj studiji i takođe, pokazali da vrsta medijuma nema uticaj na telesnu težinu novorođenčadi, ali oni nisu u svojoj studiji isključili iz analize novorođenčad iz trudnoća koje su komplikovane nekim od stanja za koja se zna da mogu uticati na telesnu težinu novorođenčadi (179).

Cheung i sar., su utvrdili da je telesna dužina na rođenju usko povezana i sa neonatalnim i postneonatalnim mortalitetom, te smo zbog toga i mi u našu analizu uključili i telesnu dužinu novorođenčadi (186). Međutim, dužina dece na rođenju u studiji Lemmen i sar. je bila statistički značano različita u zavisnosti od vrste korišćenog medijuma (179). Oni su utvrdili da su deca na dan 2 embrio transfera u Medicult grupi kraća od dece na dan 2 embrio transfera u Cook grupi. Štaviše Hassani i sar., su pokazali da su deca, čiji su embrioni kultivisani u ISM 1 medijumu duža od dece čiji su embrioni kultivisani u GI.5 Vitrolife medijumu (176). U našoj studiji nije postojala razlika u prosečnoj dužini dece na rođenju u zavisnosti od vrste korišćenog medijuma. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima koje su dobili Lin i sar. kada su poredili telesnu dužinu novorođenčadi iz jednoplodnih i blizanačkih trudnoća čiji su embrioni kultivisani u tri različite vrste medijuma i to GI.5 (Vitrolife) ili Global ili Quinn's advantage medijum (Sage) (169), kao i Wunder i sar. poredeći Vitrolife i Cook medijum (174).

Mi smo primenili multiplu regresionu analizu kako bi utvrdili odnos između confounding (engl.) faktora i telesne težine i dužine novorođenčadi. Rezultati ove analize su pokazali da vrsta medijuma za kulturu embriona nema uticaja na telesnu težinu i dužinu novorođenčadi, dok je nezavisni factor, kao što je broj prethodno rađenih procedura vantelesnog oplodjenja, imao uticaj. Pređašnje studije su pokazale da gestacijska starost i pol deteta signifikantno utiču na telesnu težinu dece na rođenju

(167, 169, 179). Dok su, Nelissen i sar. u svojoj multiploj regresionoj analizi pokazali statistički značajnu korelaciju između vrste korišćenog medijuma za kulturu embriona i telesne težine na rođenju (173).

Brojne studije na životinjama su ukazale na povezanost različitih sastava medijuma za kulturu embriona i epigenetsku nestabilnost tokom ranog embrionalnog razvoja (187,188, 189). Precizna genska metilacija je od ključnog značaja za programirane događaje koji regulišu ranu embriogenezu (56, 190). Zbog toga promene u epigenetskom obrascu mogu imati negativan efekat na razvoj i genetsko utiskivanje (engl.imprinting). Štaviše, kod miševa, serumske komponente u medijumima za kulturu embriona su održene sa nižom telesnom težinom na rođenju, dovodeći do supresije regulacije H19 i Igf2 u poređenju sa embrionima čija je kultura obavljena u medijumima bez prisutnog seruma (172). U našoj studiji u medijumima koje smo koristili bili su zastupljene različite vrste seruma, ali to nije imalo uticaja na telesnu težinu i dužinu dece na rođenju.

Regresioni modeli

Sa ciljem da utvrdimo uticaj korišćenih medijuma za kulturu embriona na kliničku trudnoću kao ishod, koristili smo logistički regresioni model i utvrdili smo da je šansa da dođe do kliničke trudnoće za 52% veća ukoliko se koristi Cook medijum u odnosu na Medicult. Kada smo porođaj koristili kao ishod, utvrdili smo da je 42% veća šansa da pacijentkinje rode živo dete kada se koristi Cook medijum u odnosu na Medicult medijum.

Sa ciljem da utvrdimo uticaj inkubatora na kliničku trudnoću kao ishod koristili smo logistički regresioni model i utvrdili smo da je šansa da dođe do kliničke trudnoće za 41% veća ukoliko se koristi K-Minc inkubator u odnosu na Haracell. Kada smo porođaj koristili kao ishod, utvrdili smo da je 9,8% veća šansa da pacijentkinje rode živo dete kada se koristi K-Minc inkubator u odnosu na Haracell, ali ta razlika nije statistički značajna.

Na osnovu rezultata finalnog modela, jasno je da je najbolja kombinacija za ishod kliničku trudnoću Kminc + Cook, za 42% veća je šansa da dođe do kliničke trudnoće u odnosu na Heracell + Cook, odnosno skoro dva puta veća šansa u odnosu na Heracell + Medicult. Dok je šansa da se rodi živo dete manja za 28,9% ukoliko se radi o

Heracell+Medicult u odnosu na Heracell+Cook i ova šansa je statistički značajna. Nasuprot tome, šansa da se rodi živo dete je 9,8% veća ukoliko se radi o Kminc+Cook u odnosu na Heracell+Cook i ova šansa nije statistički značajna.

ZAKLJUČAK

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

1. Vrsta korišćenog medijuma ima uticaj na stopu biohemijskih, kliničkih, uznapredovalih trudnoća i stopu živorođene dece
2. Vrsta korišćenog medijuma nema uticaj na fertilizacionu i implantacionu stopu
3. Vrsta korišćenog inkubatora ima uticaj na stopu fertilizacije, stopu implantacije, stopu biohemijskih, kliničkih i uznapredovalih trudnoća, kao i na stopu živorođene dece
4. Vrsta korišćenog medijuma, vrsta korišćenog inkubatora, kao i njihove kombinacije nema uticaja na telesnu težinu i telesnu dužinu terminske novorođenčadi
5. Šansa da dođe do kliničke trudnoće za 52% veća ukoliko se koristi Cook medijum u odnosu na Medicult.
6. Šansa da pacijentkinje rode živo dete je za 42% veća kada se koristi Cook medijum u odnosu na Medicult medijum.
7. Šansa da dođe do kliničke trudnoće za 41% veća ukoliko se koristi K-Minc inkubator u odnosu na Haracell inkubator.
8. Šansa da pacijentkinje rode živo dete kada se koristi K-Minc inkubator u odnosu na Haracell inkubator je za 9,8% veća, ova šansa nije statistički značajna.
9. Najbolja kombinacija za kliničku trudnoću je Kminc + Cook, i ona daje za 42% veću šansu da dođe do kliničke trudnoće u odnosu na Heracell + Cook
10. Najbolja kombinacija za kliničku trudnoću je Kminc + Cook, i ona daje, skoro dva puta veću šansu u odnosu na Heracell + Medicult.
11. Šansa da se rodi živo dete je manja za 28,9% ukoliko se radi o Heracell+Medicult u odnosu na Heracell+Cook kombinaciju.
12. Šansa da se rodi živo dete je 9,8% veća ukoliko se radi o Kminc+Cook u odnosu na Heracell+Cook i ova šansa nije statistički značajna.

LITERATURA

1. Kupka MS, Ferraretti AP, de Mouzon J, Erb K, D'Hooghe T, Castilla JA, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE dagger. *Hum Reprod.* 2014;29(10):2099–113.
2. Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Adamson GD, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) world report: Assisted reproductive technology 2003. *Fertil Steril.* 2011;95(7).
3. de Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod. England; August 2010;25(8):1851–62.*
4. Zech NH, Zech M, Baldauf S, Comploj G, Murtinger M, Spitzer D, et al. Ovarian Stimulation in ART - Unwinding Pressing Issues. *Minerva Ginecol [Internet].* 2015; Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25668422>
5. Porter RN, Smith W, Craft IL, Abdulwahid NA, Jacobs HS. Induction of ovulation for in-vitro fertilisation using busarelin and gonadotropins. *Lancet;* 1984:1284–5.
6. 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.
7. Coccia ME, Comparetto C, Bracco GL, Scarselli G. GnRH antagonists. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. Ireland;* July 2004;115:44–56.
8. 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. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17(4):303–15.
9. Tarlatzis BC, Fauser BC, Kolibianakis EM, Diedrich K, Devroey P, Aboulghar M, et al. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Human Reproduction Update.* 2006; 333–40.
10. 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 Vis ObGyn.* 2012;4(2):82–7.
11. 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. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1990;7(2):94–7.
 12. 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.
 13. 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. *Int J Fertil Steril.* 2013;6(4):266–71.
 14. Cohen J, Rieger D. Historical background of gamete and embryo culture. *Methods Mol Biol.* 2012;912:1–18.
 15. Lane M, Mitchell M, Cashman KS, Feil D, Wakefield S, Zander-Fox DL. To QC or not to QC: The key to a consistent laboratory? *Reproduction, Fertility and Development.* 2008; 23–32.
 16. Boone WR, Iii HLH, Johnson JE. Quality management issues in the assisted reproduction laboratory. *J Reprod Stem Cell Biotechnol.* 2010; 30:107.
 17. Swain JE. Decisions for the IVF laboratory: Comparative analysis of embryo culture incubators. *Reprod Biomed Online* 2014;28(5):535–47.
 18. Swain JE. Is there an optimal pH for culture media used in clinical IVF? *Hum Reprod Update.* 2012;18(3):333–9.
 19. Bavister B. Oxygen concentration and preimplantation development. *Reprod Biomed Online* 2004;9(5):484–6.
 20. Bontekoe S, Mantikou E, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;7:CD008950.
 21. Mantikou E, Bontekoe S, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive

- technologies. *Hum Reprod Update*. 2013;19(3):209.
22. Eng LA, Kornegay ET, Huntington J, Wellman T. Effects of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil*. 1986;76(2):657–62.
 23. Kimmel GL, Williams PL, Claggett TW, Kimmel CA. Response-surface analysis of exposure-duration relationships: The effects of hyperthermia on embryonic development of the rat in vitro. *Toxicol Sci*. 2002;69(2):391–9.
 24. Abramczuk JW, Lopata A. Incubator performance in the clinical in vitro fertilization program: importance of temperature conditions for the fertilization and cleavage of human oocytes. *Fertil Steril*. 1986;46(1):132–4.
 25. Walker MW, Butler JM, Higdon HL 3rd, Boone WR. Temperature variations within and between incubators-a prospective, observational study. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(12):1583–5.
 26. Higdon HL, Blackhurst DW, Boone WR. Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertil Steril*. 2008;89(3):703–10.
 27. KH H, EJ F, Lee H, KM F, Treff N, Scott R. Optimizing the temperature for embryo culture in IVF: A randomized controlled trial (RCT) comparing standard culture temperature of 37C to the reduced more physiologic temperature of 36C. *Fertil Steril* 2012;98 Suppl 1(3):167-189.
 28. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril*. 1985;44(4):493–8.
 29. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update*. 1995;1(2):91–148.
 30. Karamalegos C, Boiton VN. A prospective comparison of “in house” and commercially prepared Earle’s balanced salt solution in human in-vitro fertilization. *Human Reproduction*. 1999; 1842–6.
 31. Quinn P. The development and impact of culture media for assisted reproductive technologies. *Fertil Steril*. 2004; 27–9.
 32. Pool TB. Development of culture media for human assisted reproductive technology. *Fertil Steril*. 2004;81(2):287–9.
 33. Lane M, Gardner DK. Embryo culture medium: which is the best? *Best Pract Res*

- Clin Obstet Gynaecol. 2007;21(1):83–100.
34. 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. *Clin Exp Reprod Med*. 2014;41(1):9–14.
 35. Iyoke CA, Ugwu GO, Ezugwu FO, Ajah LO, Mba SG. The role of ultrasonography in in-vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Niger J Med* 2013;22(3):162–70.
 36. Broussin B, Jayot S, Subtil D, Parneix I, Audebert A, Dubecq F, et al. [Difficult embryo transfers: contribution of echography]. *Contracept Fertil Sex*. 1998; 26(7-8):492–7.
 37. Richardson MC, Guo M, Fauser BCJM, Macklon NS. Environmental and developmental origins of ovarian reserve. *Hum Reprod Update*. 2014; 20(3):353–69.
 38. Fuentes A, Escalona J, Céspedes P, Repetto V, Iñiguez G. [Effects of smoking on plasma antimüllerian hormone concentrations among infertile women]. *Rev Med Chil* 2013;141(1):23–7.
 39. Jaiswar SP, Natu SM, Sujata, Sankhwar PL, Manjari G. Prediction of Poor Ovarian response by Biochemical and Biophysical Markers: A Logistic Regression Model. *J Obstet Gynaecol India*. 2015;65(6):411–6.
 40. Oktem M, Guler I, Erdem M, Erdem A, Bozkurt N, Karabacak O. Comparison of the effectiveness of clomiphene citrate versus letrozole in mild IVF in poor prognosis subfertile women with failed IVF cycles. *Int J Fertil Steril*. 2015;9(3):285–91.
 41. Neveu S, Hedon B, Bringer J, Chinchole JM, Arnal F, Humeau C, et al. Ovarian stimulation by a combination of a gonadotropin-releasing hormone agonist and gonadotropins for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1987;47(4):639–43.
 42. Kadi S, Wiesing U. Uninformed Decisions? The Online Presentation of Success and Failure of IVF and Related Methods on German IVF Centre Websites. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2015;75(12):1258–63.
 43. McLernon DJ, Maheshwari A, Lee AJ, Bhattacharya S. Cumulative live birth rates after one or more complete cycles of IVF: a population-based study of

- linked cycle data from 178 898 women. *Hum Reprod.* 2016;31(3):572–81.
44. Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S, Maheshwari A. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2012;18(5):485–503.
 45. Pinborg A, Wennerholm UB, Romundstad LB, Loft A, Aittomaki K, Söderström-Anttila V, et al. Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update.* 2013; 87–104.
 46. Daniel Y, Schreiber L, Geva E, Amit a, Pausner D, Kupfermanc MJ, et al. Do placentae of term singleton pregnancies obtained by assisted reproductive technologies differ from those of spontaneously conceived pregnancies? *Hum Reprod.* 1999;14(4):1107–10.
 47. Daniel Y, Schreiber L, Geva E, Lessing JB, Bar-Am A, Amit A. Morphologic and histopathologic characteristics of placentas from twin pregnancies spontaneously conceived and from reduced and nonreduced assisted reproductive technologies. *J Reprod Med.* 2001;46(8):735–42.
 48. Fujii M, Matsuoka R, Bergel E, Van Der Poel S, Okai T. Perinatal risk in singleton pregnancies after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2010;94(6):2113–7.
 49. Healy DL, Breheny S, Halliday J, Jaques A, Rushford D, Garrett C, et al. Prevalence and risk factors for obstetric haemorrhage in 6730 singleton births after assisted reproductive technology in Victoria Australia. *Hum Reprod.* 2010;25(1):265–74.
 50. Esh-Broder E, Ariel I, Abas-Bashir N, Bdolah Y, Celnikier DH. Placenta accreta is associated with IVF pregnancies: A retrospective chart review. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2011;118(9):1084–9.
 51. Helmerhorst FM, Perquin D a M, Donker D, Keirse MJNC. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ.* 2004;328(7434):261.
 52. Jackson R a, Gibson K a, Wu YW, Croughan MS. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2004;103(3):551–63.
 53. Sutcliffe AG, Ludwig M. Outcome of assisted reproduction. *Lancet.* 2007; 351–9.

54. Raatikainen K, Kuivasaari-Pirinen P, Hippeläinen M, Heinonen S. Comparison of the pregnancy outcomes of subfertile women after infertility treatment and in naturally conceived pregnancies. *Hum Reprod.* 2012;27(4):1162–9.
55. Lau C, Rogers JM. Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews.* 2004;. 300–12.
56. Hales BF, Grenier L, Lalancette C, Robaire B. Epigenetic programming: From gametes to blastocyst. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology.* 2011; 652–65.
57. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia.* 1993;36(1):62–7.
58. Barker DJP, Osmond C, Forsén TJ, Kajantie E, Eriksson JG. Trajectories of growth among children who have coronary events as adults. *N Engl J Med.* 2005;353(17):1802–9.
59. Skilton MR, Viikari JSA, Juonala M, Laitinen T, Lehtimäki T, Taittonen L, et al. Fetal growth and preterm birth influence cardiovascular risk factors and arterial health in young adults: The cardiovascular risk in young finns study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(12):2975–81.
60. Horsthemke B, Ludwig M. Assisted reproduction: The epigenetic perspective. *Human Reproduction Update.* 2005; 473–82.
61. Fernández-Gonzalez R, Ramirez MA, Bilbao A, De Fonseca FR, Gutiérrez-Adán A. Suboptimal in vitro culture conditions: An epigenetic origin of long-term health effects. *Mol Reprod Dev.* 2007;74(9):1149–56.
62. Pandian Z, Bhattacharya S, Templeton a. Review of unexplained infertility and obstetric outcome: a 10 year review. *Hum Reprod* 2001;16(12):2593–7.
63. T.F. M, P.H. W. Fertility therapy and the risk of very low birth weight [Internet]. *Obstetrics and Gynecology.* 1997; 600–5.
64. Wang JX, Norman RJ, Kristiansson P. The effect of various infertility treatments on the risk of preterm birth. *Hum Reprod.* 2002;17(4):945–9.
65. Zhu JL, Basso O, Obel C, Hvidtjørn D, Olsen J. Infertility, infertility treatment and psychomotor development: The Danish National Birth Cohort. *Paediatr*

- Perinat Epidemiol. 2009;23(2):98–106.
66. Cooper AR, O'Neill KE, Allsworth JE, Jungheim ES, Odibo AO, Gray DL, et al. Smaller fetal size in singletons after infertility therapies: The influence of technology and the underlying infertility. *Fertil Steril*. 2011;96(5):1100–6.
 67. Thompson JG, Gardner DK, Pugh P a, McMillan WH, Tervit HR. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod* 1995;53(6):1385–91.
 68. Lane M, Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod*. 2003;69(4):1109–17.
 69. Rooke JA, McEvoy TG, Ashworth CJ, Robinson JJ, Wilmot I, Young LE, et al. Ovine fetal development is more sensitive to perturbation by the presence of serum in embryo culture before rather than after compaction. *Theriogenology*. 2007;67(3):639–47.
 70. 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. *Fertil Steril*. 2016;
 71. Bellver J, Melo MAB, Bosch E, Serra V, Remohí J, Pellicer A. Obesity and poor reproductive outcome: the potential role of the endometrium. *Fertil Steril*. 2007;88(2):446–51.
 72. Zaadstra BM, Seidell JC, Vannoord PAH, Tevelde ER, Habbema JDF, Vrieswijk B, et al. Fat and Female Fecundity - Prospective-Study of Effect of Body-Fat Distribution on Conception Rates. *Br Med J* 1993;306(6876):484–7.
 73. Rich-Edwards JW, Goldman MB, Willett WC, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;171(1):171–7.
 74. Crosignani PG, Ragni G, Parazzini F, Wyssling H, Lombroso G, Perotti L. Anthropometric indicators and response to gonadotrophin for ovulation induction. *Hum Reprod*. 1994;9(3):420–3.
 75. Van Der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Burggraaff JM, et al. Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Hum Reprod*. 2008;23(2):324–8.

76. Dechanet C, Anahory T, Mathieu Daude JC, Quantin X, Reyftmann L, Hamamah S, et al. Effects of cigarette smoking on reproduction. *Hum Reprod Update*. 2011;17(1):76–95.
77. Pineles BL, Park E, Samet JM. Systematic review and meta-analysis of miscarriage and maternal exposure to tobacco smoke during pregnancy. *Am J Epidemiol*. 2014;179(7):807–23.
78. Lintsen AME, Pasker-de Jong PCM, de Boer EJ, Burger CW, Jansen CAM, Braat DDM, et al. Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate of IVF. *Hum Reprod*. 2005;20(7):1867–75.
79. Best D, Bhattacharya S. Obesity and fertility. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2015;24(1):5–10.
80. Malizia B a, Hacker MR, Penzias AS. Cumulative live-birth rates after in vitro fertilization. *N Engl J Med*. 2009;360(3):236–43.
81. Maheshwari A, Stofberg L, Bhattacharya S. Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology--a systematic review. *Hum Reprod Update* 2007;13(5):433–44.
82. Spandorfer D, Kump L, Goldschlag D, Brodtkin T, Davis K, Rosenwaks Z. Obesity and in vitro fertilization: negative influences on outcome. *J Reprod Med*. 2004;49(12):973.
83. Ozekinci M, Seven A, Olgan S, Sakinci M, Keskin U, Akar ME, et al. Does obesity have detrimental effects on IVF treatment outcomes? *BMC Womens Health* 2015;15:61.
84. Souter I, Baltagi LM, Kuleta D, Meeker JD, Petrozza JC. Women, weight, and fertility: the effect of body mass index on the outcome of superovulation/intrauterine insemination cycles. *Fertil Steril*. 2011;95(3):1042–7.
85. Akpınar F, Demir B, Dilbaz S, Kaplanoğlu I, Dilbaz B. Obesity is not associated with the poor pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection in women with polycystic ovary syndrome. *J Turkish Ger Gynecol Assoc*. 2014;15(3):144–8.
86. Esinler I, Bozdog G, Yarali H. Impact of isolated obesity on ICSI outcome. *Reprod Biomed Online* 2008;17(4):583–7.
87. Imudia AN, Awonuga AO, Doyle JO, Kaimal AJ, Wright DL, Toth TL, et al.

- Peak serum estradiol level during controlled ovarian hyperstimulation is associated with increased risk of small for gestational age and preeclampsia in singleton pregnancies after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2012;97(6):1374–9.
88. Chung K, Coutifaris C, Chalian R, Lin K, Ratcliffe SJ, Castelbaum AJ, et al. Factors influencing adverse perinatal outcomes in pregnancies achieved through use of in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2006;86(6):1634–41.
 89. Zhao J, Zhang Q, Li Y. The effect of endometrial thickness and pattern measured by ultrasonography on pregnancy outcomes during IVF-ET cycles. *Reprod Biol Endocrinol*. England; 2012;10:100.
 90. Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Endometrial pattern, thickness and growth in predicting pregnancy outcome following 3319 IVF cycle. *Reprod Biomed Online*. 2014;29(3):291–8.
 91. Kasius A, Smit JG, Torrance HL, Eijkemans MJC, Mol BW, Opmeer BC, et al. Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2014;20(4):530–41.
 92. Yuval Y, Lipitz S, Dor J, Achiron R. The relationships between endometrial thickness, and blood flow and pregnancy rates in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1999;14(4):1067–71.
 93. Jungheim ES, Travieso JL, Hopeman MM. Weighing the impact of obesity on female reproductive function and fertility. *Nutr Rev*. 2013;71.
 94. Fedorcsák P, Dale PO, Storeng R, Tanbo T, Abyholm T. The impact of obesity and insulin resistance on the outcome of IVF or ICSI in women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod*. 2001;16(6):1086–91.
 95. Loh S, Wang JX, Matthews CD. The influence of body mass index, basal FSH and age on the response to gonadotrophin stimulation in non-polycystic ovarian syndrome patients. *Hum Reprod* 2002;17(5):1207–11.
 96. Mulders AGMGJ, Laven JSE, Eijkemans MJC, Hughes EG, Fauser BCJM. Patient predictors for outcome of gonadotrophin ovulation induction in women with normogonadotrophic anovulatory infertility: A meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 2003; 429–49.
 97. Matalliotakis I, Cakmak H, Sakkas D, Mahutte N, Koumantakis G, Arici A. Impact of body mass index on IVF and ICSI outcome: a retrospective study.

- Reprod Biomed Online 2008;16(6):778–83.
98. Dechaud H, Anahory T, Reyftmann L, Loup V, Hamamah S, Hedon B. Obesity does not adversely affect results in patients who are undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Eur J Obs Gynecol Reprod Biol* 2006;127(1):88–93.
 99. Farhi J, Ben-Haroush A, Sapir O, Fisch B, Ashkenazi J. High-quality embryos retain their implantation capability in overweight women. *Reprod Biomed Online*. 2010;21(5):706–11.
 100. Ge ZJ, Schatten H, Zhang CL, Sun QY. Oocyte ageing and epigenetics. *Reproduction*. 2015;149(3):103–14.
 101. Ferraretti AP, Goossens V, Kupka M, Bhattacharya S, de Mouzon J, Castilla JA, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2013;28(9):2318–31.
 102. 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. *J Assist Reprod Genet*. 2004;21(8):291–5.
 103. Sunderam S, Kissin DM, Flowers L, Anderson JE, Folger SG, Jamieson DJ, et al. Assisted reproductive technology surveillance 2009; *MMWR Surveill Summ* 2012;61(7):1–23.
 104. 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. *Ann Acad Med Singapore* 1993;22(3):351–4.
 105. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, D'Angelo D, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online* 2008;16(6):835–41.
 106. Swain JE, Pool TB. New pH-buffering system for media utilized during gamete and embryo manipulations for assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(6):799–810.
 107. Kovacic B, Sajko MC, Vlasisavljević V. A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of

- intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2010;94(2):511–9.
108. 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 Histochem Cytobiol.* 2007;45 Suppl 1:115–7.
 109. 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. *Reprod Biomed Online.* 2010;21(6):762–8.
 110. 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.
 111. Staessen C, Van den Abbeel E, Janssenswillen C, Devroey P, Van Steirteghem AC. Controlled comparison of Earle's balanced salt solution with Menezo B2 medium for human in-vitro fertilization performance. *Hum Reprod.* 1994;9(10):1915–9.
 112. Mauri AL, Petersen CG, Baruffi RL, Franco JGJ. A prospective, randomized comparison of two commercial media for ICSI and embryo culture. *J Assist Reprod Genet.* 2001;18(7):378–81.
 113. Zollner K-P, Zollner U, Schneider M, Dietl J, Steck T. Comparison of two media for sequential culture after IVF and ICSI shows no differences in pregnancy rates: a randomized trial. *Med Sci Monit.* 2004;10(1):CR1–7.
 114. Van Langendonck A, Demylle D, Wyns C, Nisolle M, Donnez J. Comparison of G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study. *Fertil Steril.* 2001; 1023–31.
 115. Aoki VW, Wilcox AL, Peterson CM, Parker-Jones K, Hatasaka HH, Gibson M, et al. Comparison of four media types during 3-day human IVF embryo culture. *Reprod Biomed Online* 2005;10(5):600–6.
 116. Sifer C, Handelsman D, Grange E, Porcher R, Poncelet C, Martin-Pont B, et al. An auto-controlled prospective comparison of two embryos culture media (G III series versus ISM) for IVF and ICSI treatments. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26(11-12):575–81.
 117. Dumoulin JC, Land JA, Van Montfoort AP, Nelissen EC, Coonen E, Derhaag

- JG, et al. Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum Reprod* 2010;25(3):605–12.
118. Xella S, Marsella T, Tagliasacchi D, Giulini S, La Marca A, Tirelli A, et al. Embryo quality and implantation rate in two different culture media: ISM1 versus Universal IVF Medium. *Fertil Steril*. 2010;93(6):1859–63.
 119. Lin S, Li R, Zheng X, Chi H, Ren X, Yang R, et al. Influence of embryo culture medium on incidence of ectopic pregnancy in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2015;
 120. Santos-Ribeiro S, Tournaye H, Polyzos NP. Trends in ectopic pregnancy rates following assisted reproductive technologies in the UK: a 12-year nationwide analysis including 160 000 pregnancies. *Hum Reprod*. 2016;31(2):393–402.
 121. Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*. 1993;99(2):673–9.
 122. Maas DH, Storey BT, Mastroianni LJ. Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril*. 1976;27(11):1312–7.
 123. Mastroianni LJ, Jones R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fertil*. 1965;9:99–102.
 124. Mitchell JA, Yochim JM. Measurement of intrauterine oxygen tension in the rat and its regulation by ovarian steroid hormones. *Endocrinology*. 1968;83(4):691–700.
 125. Kaufman DL, Mitchell J a. Intrauterine oxygen tension during the oestrous cycle in the hamster: Patterns of change. *Comp Biochem Physiol - A Physiol*. 1994;107(4):673–8.
 126. Pabon Jr. JE, Findley WE, Gibbons WE. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril* 1989;51(5):896–900.
 127. Rinaudo PF, Giritharan G, Talbi S, Dobson AT, Schultz RM. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril*. 2006;86(4 Suppl):1252–65, 1265.e1–36.
 128. Quinn P, Harlow GM. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J Exp Zool*. 1978;206(1):73–80.
 129. Harlow GM, Quinn P. Foetal and placental growth in the mouse after pre-

- implantation development in vitro under oxygen concentrations of 5 and 20%. *Aust J Biol Sci* 1979;32(3):363–9.
130. Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev.* 1992;31(1):28–33.
 131. Kishi J, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. Block to development in cultured rat 1-cell embryos is overcome using medium HECM-1. *Hum Reprod.* 1991;6(10):1445–8.
 132. McKiernan SH, Bavister BD. Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 1990;43(3):404–13.
 133. Li J, Foote RH. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen. *J Reprod Fertil* 1993;98(1):163–7.
 134. Karja NWK, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, et al. Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine in vitro fertilized embryos. *Theriogenology.* 2004;62(9):1585–95.
 135. Batt PA, Gardner DK, Cameron AW. Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod Fertil Dev* 1991;3(5):601–7.
 136. Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil.* 1990;89(2):573–8.
 137. Leoni GG, Rosati I, Succu S, Bogliolo L, Bebbere D, Berlinguer F, et al. A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of in vitro produced ovine blastocysts. *Reprod Domest Anim.* 2007;42(3):299–304.
 138. Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FOJ, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, et al. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology.* 2003;59(7):1585–96.
 139. Bean CJ, Hassold TJ, Judis L, Hunt P a. Fertilization in vitro increases non-disjunction during early cleavage divisions in a mouse model system. *Hum Reprod.* 2002;17(9):2362–7.
 140. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings.

- Human Reproduction Update. 2001; 175–89.
141. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AAN, Sharma RK, Worley SE, et al. Differential growth of human embryos in vitro: Role of reactive oxygen species. *Fertil Steril*. 2004;82(3):593–600.
 142. Dumoulin JC, Meijers CJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JP, Evers JL. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. *Hum Reprod*. 1999;14(2):465–9.
 143. Kovacic B, Vlaisavljevic V. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(2):229–36.
 144. Ciray HN, Aksoy T, Yaramanci K, Karayaka I, Bahceci M. In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes. *Fertil Steril*. 2009;91(4 SUPPL.):1459–61.
 145. Waldenström U, Engström AB, Hellberg D, Nilsson S. Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertil Steril*. 2009;91(6):2461–5.
 146. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod* 2000;15 Suppl 2:199–206.
 147. Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, et al. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum Reprod*. 2009;24(2):300–7.
 148. Kea B, Gebhardt J, Watt J, Westphal LM, Lathi RB, Milki AA, et al. Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2007;87(1):213–6.
 149. Bahceci M, Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F. Effect of oxygen concentration during the incubation of embryos of women undergoing ICSI and embryo transfer: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 2005;11(4):438–43.
 150. Kasterstein E, Strassburger D, Komarovskiy D, Bern O, Komsky A, Raziel A, et al. The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo

- development in a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(8):1073–9.
151. Fujiwara M, Takahashi K, Izuno M, Duan YR, Kazono M, Kimura F, et al. Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: Comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24(1):5–9.
 152. Cooke S, Tyler JPP, Driscoll G. Objective assessments of temperature maintenance using in vitro culture techniques. *J Assist Reprod Genet* 2002;19(8):368–75.
 153. Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martinez M, Perez-Cano I, et al. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28(7):569–73.
 154. Anifandis G. Temperature variations inside commercial IVF incubators. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(12):1587–8.
 155. Park H, Bergh C, Selleskog U, Thurin-Kjellberg A, Lundin K. No benefit of culturing embryos in a closed system compared with a conventional incubator in terms of number of good quality embryos: Results from an RCT. *Hum Reprod.* 2015;30(2):268–75.
 156. Calzi F, Papaleo E, Rabellotti E, Ottolina J, Vailati S, Vigano P, et al. Exposure of embryos to oxygen at low concentration in a cleavage stage transfer program: reproductive outcomes in a time-series analysis. *Clin Lab.* 2012;58(9-10):997–1003.
 157. Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG. Oxygen-Regulated Gene Expression in Bovine Blastocysts 1. Liver. 2004;1119(May):1108–19.
 158. Fernando D, Halliday JL, Breheny S, Healy DL. Outcomes of singleton births after blastocyst versus nonblastocyst transfer in assisted reproductive technology. *Fertil Steril.* 2012;97(3):579–84.
 159. Hayashi M, Nakai A, Satoh S, Matsuda Y. Adverse obstetric and perinatal outcomes of singleton pregnancies may be related to maternal factors associated with infertility rather than the type of assisted reproductive technology procedure

- used. *Fertil Steril*. 2012;98(4):922–8.
160. D'Angelo D V., Whitehead N, Helms K, Barfield W, Ahluwalia IB. Birth outcomes of intended pregnancies among women who used assisted reproductive technology, ovulation stimulation, or no treatment. *Fertil Steril*. 2011;96(2).
 161. Shih W, Rushford DD, Bourne H, Garrett C, McBain JC, Healy DL, et al. Factors affecting low birthweight after assisted reproduction technology: Difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection. *Hum Reprod*. 2008;23(7):1644–53.
 162. Messerlian C, Maclagan L, Basso O. Infertility and the risk of adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2013;28(1):125–37.
 163. Kalra SK. Adverse perinatal outcome and in vitro fertilization singleton pregnancies: what lies beneath? Further evidence to support an underlying role of the modifiable hormonal milieu in in vitro fertilization stimulation. *Fertil Steril*. 2012;97(6):1295–6.
 164. Reubinoﬀ BE, Samueloﬀ A, Ben-Haim M, Friedler S, Schenker JG, Lewin A. Is the obstetric outcome of in vitro fertilized singleton gestations different from natural ones? A controlled study. *Fertil Steril*. 1997;67(6):1077–83.
 165. Pelinck MJ, Hadders-Algra M, Haadsma ML, Nijhuis WL, Kiewiet SM, Hoek A, et al. Is the birthweight of singletons born after IVF reduced by ovarian stimulation or by IVF laboratory procedures? *Reprod Biomed Online*. 2010;21(2):245–51.
 166. Hu JCY, Seo BK, Neri Q V., Rozenwaks Z, Palermo GD, Fields T, et al. ANDROLOGY. *Hum Reprod* 2012;27(suppl 2):121–50.
 167. Vergouw CG, Kostelijk EH, Doejaaren E, Hompes PGA, Lambalk CB, Schats R. The influence of the type of embryo culture medium on neonatal birthweight after single embryo transfer in IVF. *Hum Reprod*. 2012;27(9):2619–26.
 168. Eaton JL, Lieberman ES, Stearns C, Chinchilla M, Racowsky C. Embryo culture media and neonatal birthweight following IVF. *Hum Reprod*. 2012;27(2):375–9.
 169. Lin S, Li M, Lian Y, Chen L, Liu P. No effect of embryo culture media on birthweight and length of newborns. *Hum Reprod* 2013;28(7):1762–7.
 170. Zhu J, Lin S, Li M, Chen L, Lian Y, Liu P, et al. Effect of in vitro culture period

- on birthweight of singleton newborns. *Hum Reprod.* 2014;29(3):448–54.
171. Romundstad LB, Romundstad PR, Sunde A, von Düring V, Skjærven R, Gunnell D, et al. Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study. *Lancet.* 2008;372(9640):737–43.
 172. Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod.* 2001;64(3):918–26.
 173. Nelissen EC, Van Montfoort AP, Coonen E, Derhaag JG, Geraedts JP, Smits LJ, et al. Further evidence that culture media affect perinatal outcome: findings after transfer of fresh and cryopreserved embryos. *Hum Reprod.* 2012;27(7):1966–76.
 174. Wunder D, Ballabeni P, Roth-Kleiner M, Primi M-P, Senn A, Chanson A, et al. Effect of embryo culture media on birthweight and length in singleton term infants after IVF-ICSI. *Swiss Med Wkly* 2014;144(10):w14038.
 175. Kleijkers SHM, Van Montfoort APA, Smits LJM, Viechtbauer W, Roseboom TJ, Nelissen ECM, et al. IVF culture medium affects post-natal weight in humans during the first 2 years of life. *Hum Reprod.* 2014;29(4):661–9.
 176. Hassani F, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Rezazadeh Valojerdi M, Movaghar B, Fazel M, et al. The Effects of ISM1 Medium on Embryo Quality and Outcomes of IVF/ICSI Cycles. *Int J Fertil Steril.* 2013;7(2):108–15.
 177. Eskild A, Monkerud L, Tanbo T. Birthweight and placental weight; do changes in culture media used for IVF matter? Comparisons with spontaneous pregnancies in the corresponding time periods. *Hum Reprod* 2013;28(12):3207–14.
 178. Carrasco B, Boada M, Rodríguez I, Coroleu B, Barri PN, Veiga A. Does culture medium influence offspring birth weight? *Fertil Steril.* 2013;100(5):1283–8.
 179. Lemmen JG, Pinborg A, Rasmussen S, Ziebe S. Birthweight distribution in ART singletons resulting from embryo culture in two different culture media compared with the national population. *Hum Reprod.* 2014;29(10):2326–32.
 180. F. G, J. G, Y.W. X, C.Q. Z. The effects of two different embryo culture media on the birthweight of singletons: Findings after fresh and frozen-thawed embryo transfer. *Hum Reprod* 2015;30:i369.

181. Schieve L a, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med.* 2002;346(10):731–7.
182. Pinborg A, Loft A, Andersen AN. Neonatal outcome in a Danish national cohort of 8602 children born after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection: The role of twin pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004;83(11):1071–8.
183. Ceelen M, van Weissenbruch MM, Vermeiden JPW, van Leeuwen FE, Delemarre-van de Waal HA. Growth and development of children born after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2008;90(5):1662–73.
184. Land JA. How should we report on perinatal outcome? *Human Reproduction.* 2006; 2638–9.
185. Zandstra H, Van Montfoort APA, Dumoulin JCM. Does the type of culture medium used influence birthweight of children born after IVF? *Human Reproduction.* 2015; 530–42.
186. Cheung YB, Yip PSF, Karlberg JPE. Size at birth and neonatal and postneonatal mortality. *Acta Paediatr.* 2002;91(14):447–52.
187. Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet.* 2001;27(2):153–4.
188. Rivera RM, Stein P, Weaver JR, Mager J, Schultz RM, Bartolomei MS. Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Hum Mol Genet.* 2008;17(1):1–14.
189. Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruip T, Niemann H, et al. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod.* 2002;67(3):767–75.
190. Shi L, Wu J. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:59.

SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

- WHO - World Health Organization (svetska zdravstvena organizacija)
- VTO - vantelesno oplodjenje
- KOH - kontrolisana ovarijalna hiperstimulacijastimulacija
- ET - embrio transfer
- IVF - in vitro fertilizacija
- ICSI - intracytoplasmatic sperm injection (intracitoplazmatična injekcija spermatozoida)
- HMG - humani menopauzalni gonadotropini
- rFSH - rekombinantni folikulostimulirajući hormon
- rLH - rekombinantni luteinizirajući hormone
- GnRH - gonadotropni rilizing hormon
- hCG - humani horionski gonadotropin
- AFC - antral follicular count (broj antralnih folikula)
- OV - ovarian volumene (merenje volumena jajnika)
- BMI - body mass index (indeks telesne težine)
- PCO - policistični ovarijumi
- PCOS - sindrom policističnih ovarijuma
- IGF-1 - Insulin-like growth factor 1
- IGFBP-1 - Insulin-like growth factor-binding protein 1
- SHBG - Sex hormone-binding globulin
- BMPO - biomedicinski potpomognuto oplodjenje
- ART - arteficiojne reproduktivne tehnologije
- HbsAg - hepatitis B površinski antigen
- HCV - hepatitis C virus
- HIV - virus humane imunodeficijencije
- VDRL - Venereal Disease Research Laboratory (test na sifilis)
- FSH - folikulostimulirajući hormon
- LH - luteinizirajući hormone

E₂ - estradiol

Pg - progesterone

T - testosteron

TSH - tireostimulirajući hormon

T₃ - trijodtironin

T₄ - tiroksina

AMH - antimilerijan hormon

AFC - antral follicular count (broj antralnih folikula)

PN - pronukleus

ESHRE - European Society of Human Reproduction and Embryology (evropsko uderuženje za humanu reprodukciju i embriologiju)

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Biljana Arsić je rođena je 1967. godine u Zemunu.

Medicinski fakultet upisala je u Beogradu školske 1985/86 godine a diplomirala 1991. godine, sa srednjom ocenom 9,28. U toku studija, bila je demonstrator na Institutu za hemiju Medicinskog fakulteta.

Volontirala je u KBC Dr Dragiša Mišović – Dedinje od marta 1992. godine a potom je 1993. godine primljena u stalni radni odnos u istoj ustanovi. Od aprila 1998. godine je primljena u u stalni radni odnos u Ginekološko-akušerskoj klinici «Narodni Front» u Beogradu, gde i sada radi.

Specijalistički ispit iz Ginekologije i Akušerstva na Medicinskom fakultetu u Beogradu, je položila 1996. godine sa odličnom ocenom.

Magisatrsku tezu, iz uže naučne oblasti endokrinologije, pod naslovom «Primena ultrasonografije kod hirzutnih i gojaznih žena sa menstrualnim poremećajima» odbranila je 2001. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Od strane Ministarstva zdravlja Republike Srbije 2012. godine dodeljena joj je titula primarijusa.

Učestvovala je u međunarodnim i domaćim studijama i projektima, kao i u organizovanju međunarodnih i domaćih naučnih sastanaka i simpozijuma.

Bila je predavač po pozivu na kursovima laparoskopije u ginekologiji, Ian Donald međunarodnoj školi medicinskog ultrazvuka u ginekologiji i akušerstvu i prezentovala radove u vidu oralnih prezentacija i postera na stranim i domaćim kongresima.

Užu specijalizaciju iz fertiliteta i steriliteta pod nazivom «Uticaj različitih indeksa telesne mase (bmi) na ishod vantelesne oplodnje» odbranila je 2016. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu sa odličnom ocenom.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а **Biljana Arsić**

број уписа _____

Изјављујем

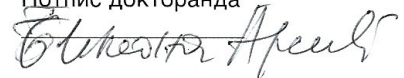
да је докторска дисертација под насловом:

Procena uticaja različitih inkubatora i medijuma u toku postupka vantelesnog
oplođenja na ishod trudnoće

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

У Београду, 29.01.2018.

Потпис докторанда



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора __ Biljana Arsić __

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада: Procena uticaja različitih inkubatora i medijuma u toku postupka vantelesnog oplodjenja na ishod trudnoće

Ментор _ Prof.dr Eliana Garalejić

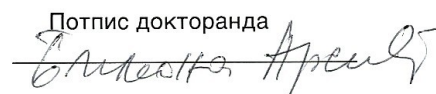
Потписани __ Biljana Arsic __

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

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

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

У Београду, 29.01.2018

Потпис докторанда


Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Procena uticaja različitih inkubatora i medijuma u toku postupka vantelesnog oplođenja na ishod trudnoće

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство- некомерцијално
3. Ауторство– некомерцијално – без прераде
4. Ауторство– некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство– без прераде
6. Ауторство– делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис је на полеђини листа).

У Београду, 29.01.2018,

Потпис докторанда
