Polimorfizam gena za receptor FSHR u albanskih žena

Gashi, Zafer

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:076035

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Zafer Gashi

Polimorfizam gena za receptor FSHR u albanskih žena

Doktorski rad

Zagreb, 2014.

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Zafer Gashi

Polymorphism of FSH receptor gene in Albanian women

Doctoral Thesis

Zagreb, 2014.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Poliklinici-IVF Center, Peje, Kosovo te u Laboratoriju za epigenetiku i molekularnu medicinu Zavoda za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u razdoblju od siječnja 2010. do veljače 2014., pod vodstvom dr. sc. Sanje Vujisić Živković, više znan. sur., u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Najsrdačnije se zahvaljujem svojoj mentorici ***dr. sc. Sanji Vujisić Živković***, višoj znanstvenoj suradnici, na svesrdnoj pomoći, profesionalnim savjetima i prijateljskoj susretljivosti tijekom cijelog trajanja izrade ovog doktorskog rada, od idejnog rješenja do njene finalne izvedbe.

Znatan dio eksperimentalnog dijela izveden je u Laboratoriju za epigenetiku i molekularnu medicinu Zavoda za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu ***„Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu- istraživačke jedinice: Biomedicinsko istraživanje reprodukcije i razvoja“*** (voditelj: prof. dr. sc. Davor Ježek).

U sklopu toga posebno se zahvaljujem dr. sc. ***Frani Paiću***, znanstvenom suradniku, višem asistentu i znanstvenom djelatniku Laboratorija za epigenetiku i molekularnu medicinu Zavoda za medicinsku biologiju Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na svesrdnoj pomoći u provedbi svih eksperimentalnih i teoretskih dijelova ovog rada, bez čije stručne pomoći, savjeta i potpore ovaj rad naprosto ne bi bio moguć.

Osim toga najtoplije se zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda, a posebno pročelnici Zavoda za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prof. dr. sc. ***Floriani Bulić-Jakuš***, dr. med., te doc. dr. sc. ***Tamari Nikuševoj Martić***, višoj znanstvenoj suradnici, na svesrdnoj pomoći, savjetima i potpori tijekom cijelog vremena eksperimentalnog rada te prijateljskom ozračju na Zavodu i u Laboratoriju.

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno matematički fakultet

Biološki odsjek

POLIMORFIZAM GENA ZA RECEPTOR FSHR U ALBANSKIH ŽENA

ZAFER GASHI

Laboratorij za epigenetiku i molekularnu medicinu, Zavod za medicinsku biologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 3

Poliklinika-IVF Center, Peje, Kosovo

U ovom doktorskom radu istražena je povezanost *Asn680Ser FSHR* polimorfizma s odgovorom ovarija na kontroliranu stimulaciju jajnika kod 104 neplodnih albanskih žena uključenih u program ICSI. Razlog neplodnosti u svim slučajevima je muški čimbenik. Analiza Asn680Ser polimorfizma izvršena je uporabom TaqMan SNP procedure. Učestalost genotipova je: Asn/Asn 22.1%, Asn/Ser 47.1% i Ser/Ser 30.8%. Analizirani su klinički i endokrinološki parametri u odnosu na genotip, dob, BMI i broj oocita. BMI je značajno veći u Ser/Ser u usporedbi sa Asn/Ser (P= 0.0152) i Asn/Asn (P= 0.0014). Osim statistički veće razine prolaktina (P= 0,0404), u grupi pretilih pacijentica (BMI ≥ 25) nije utvrđena nikakva statistički značajna razlika između dvije BMI podgrupe. Bazalni nivo E2 pokazao je statistički značajnu razliku (0.0308) između genotipskih varijanti. Statistički značajna razlika između PR i GR grupe nađena je s obzirom na dob, BMI, bFSH, AFC, dozu gonadotropina, period stimulacije, transfer embrija, broj dominantnih folikula, razinu E2 na dan hCG administracije i debljinu endometrija. Korelacijska analiza pokazala je statistički značajnu (P< 0.0001) negativnu korelaciju broja oocita u odnosu na dob, bFSH, period stimulacije i dozu gonadotropina. AFC i transfer embrija kao i broj dominantnih folikula, vrijednosti E2 na hCG dan i debljina endometrija su pokazali statistički značajnu (P< 0.0001) pozitivnu korelaciju sa brojem oocita.

Stranica: 92, slika: 23, tablica: 17, literaturnih navoda: 205, hrvatski jezik

Ključne riječi: FSHR; SNP; polimorfizam; neplodnost; kontrolirana stimulacija jajnika

Mentor: dr. sc. Sanja Vujisić Živković, viša znan. sur.

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Gordana Lacković Venturin, redovni profesor, Dr. sc., dr.med. Floriana Bulić-Jakuš, redovni professor; Dr. sc. Darko Kaštelan, docent.

Rad prihvaćen: Prosinac 2014.

University of Zagreb Ph. D. Thesis

Faculty of Science

Department of Biology

POLYMORPHISM OF FSH RECEPTOR GENE IN ALBANIAN WOMEN

ZAFER GASHI

Laboratory for Epigenetic and Molecular Medicine, Department of Medical Biology, School of Medicine, University of Zagreb, Šalata 3, 10 000 Croatia

Policlinic-IVF Center, Peje, Kosovo

This study investigated association of *Asn680Ser FSHR* polymorphism with the ovarian response in 104 women of Albanian ethnic population enrolled in ICSI program. The reason of infertility in all cases has been identified as male factor. Analysis of the Asn680Ser polymorphism was performed using TaqManR SNP Genotyping Assay. The frequencies of genotypes were: Asn/Asn 22.1%, Asn/Ser 47.1%, and Ser/Ser 30.8%. Clinical and endocrinologic parameters were analyzed based on the genotype, age, BMI and oocyte yield. BMI was significantly higher in the Ser/Ser as compared to the Asn/Ser (P= 0.0152) or the Asn/Asn group (P= 0.0014). Except significantly (P= 0.0404) higher prolactin levels in the overweight (BMI $\geq$ 25) group, no other statistically relevant differences were found between the two BMI subgroups. Basic E2 levels showed statistically significant difference (0.0308) between the genotype variants. Statistically significant differences between poor and good responders were found regarding the age, BMI, bFSH, AFC, gonadotropin dose, stimulation length, embryo transfer number and number of dominant follicle, peak E2 levels and endometrium thickness. Correlation analysis showed statistically significant (P< 0.0001) negative correlation of oocyte retrieval number in respect to age, bFSH, stimulation length and gonadotropin dose. AFC and embryo transfer number, as well as number of dominant follicle, peak E2 level and endometrium thickness have all showed statistically significant (P< 0.0001) positive correlation with oocyte yield.

Key words: FSHR; SNP; polymorphism; infertility; controlled ovarian stimulation

Pages: 92, figures: 22, tables: 17, references: 205, Croatian language

Menthor: Sanja Vujisić Živković, PhD.,

Reviewers: Gordana Lacković Venturin, Ph.D., Professor; Floriana Bulić-Jakuš, M.D, Ph.D., Professor; Darko Kaštelan, MD, PhD, Asst. Professor.

Thesis accepted: December, 2014

SADRŽAJ

1. Uvod.....1

1.1 Hipoteza rada …….....2

1. 2. Ciljevi rada …….....2

2. Literaturni pregled …….....3

2.1. Uzroci neplodnosti …….....3

2.1.1. Genetski uzročnici neplodnosti …….....5

2.1.2. Oogeneza …….....6

2.1.3. Hormonalna regulacija reprodukcije 12

2.1.4. FSHR – Receptor za folikulo-stimulirajući hormon 25

2.1.5. Liječenje neplodnosti 33

3. Ispitanici i metode 36

3.1. Ispitanici 36

3.2. Prikupljanje uzoraka pune krvi 37

3.3. Određivanje hormona 37

3.4. Postupak izvantjelesne oplodnje 38

3.5. Izolacija DNA i genotipizacija 39

3.6. Statistička analiza podataka 42

4. Rezultati 43

5. Rasprava 57

6. Zaključci 64

7. Literatura 65

8. Popis kratica i simbola.....87

9. Životopis.....89

1. UVOD

Neplodnost je složeno kliničko stanje koje zahvaća podjednako i žene i muškarce te ima izrazit utjecaj na njihovo mentalno stanje, stil života i odnos unutar para (Monga i sur., 2004; Akhondi i sur., 2013; Luk i Loke, 2014; Keramat i sur., 2014). Premda se obiteljski i socijalni pritisak za zasnivanje obitelji s djecom u različitim gospodarskim i zemljopisnim okruženjima bitno razlikuje, ono što je zajedničko svim neplodnim parovima diljem svijeta jest naglašena želja da rode zdravo dijete. Mnogi od njih smatraju to svojim osnovnim ljudskim pravom, a uporište za to nalaze u Deklaraciji o ljudskim pravima Ujedinjenih naroda, članku 16.1., u kom se navodi da "Punoljetni muškarci i žene bez ograničenja u pogledu rase, državljanstva ili vjere, imaju pravo na brak i zasnivanje obitelji". Posvajanje djece je dugo vremena predstavljalo jedinu opciju neplodnim parovima. No, stupanj do kojeg je to kulturološki i pojedinačno prihvatljivo kao i realno dostupan broj usvojive djece varira od zemlje do zemlje dok u nekim područjima još uvijek postoje brojni društveni običaji koji se odupiru ne samo napuštanju već i samom posvajanju djece (Daar i Merali, 2001).

Razvoj metoda medicinski potpomognute oplodnje (*eng. Assisted reproductive technology, ART*) sredinom prošlog stoljeća osnažio je nade i želje neplodnih parova i pojedinaca rezultirajući s vremenom sve većom potražnjom za takvim pristupom u rješavanju neplodnosti i umanjene plodnosti (*subfertilnost - bilo koji stupanj smanjene plodnosti kod parova koji bezuspješno pokušavaju ostvariti trudnoću*), kako u ekonomski razvijenim tako i u nerazvijenim dijelovima svijeta. Prema nekim procjenama, od 1978. godine, kad je u Velikoj Britaniji metodom *in vitro* oplodnje rođeno prvo dijete, do danas je diljem svijeta različitim metodama medicinski potpomognute oplodnje rođeno više od 5 milijuna djece (Allen i sur., 2006; Kamel, 2013; Talaulikar i Arulkumaran, 2012; Okun i sur., 2014). Danas su metode medicinski potpomognute oplodnje zaslužne su za 1.7 % - 4% trudnoća i uobičajeno se koriste za tretiranje primarnih i sekundarnih uzroka neplodnosti. U novije vrijeme njihova primjena proširena je i na očuvanje plodnosti kod reproduktivno zrelih pacijenata podvrgnutih gonadotoksičnom tretmanu (zračenje, kemoterapija). Osim što su metode medicinski potpomognute oplodnje izvršile značajan utjecaj na živote mnogih neplodnih i subfertilnih parova, one su također povezane s nekim od najvažnijih političkih, vjerskih, filozofskih, bioetičkih i moralnih pitanja današnjice, pogotovo otkada su se reproduktivna "čuda" našla u središtu medijske pozornosti (Londra i sur., 2014).

1. 1. HIPOTEZA RADA

Pretpostavlja se da učestalost *SNP* (*eng. single nucleotide polymorphism*) polimorfizma *Asn680Ser (2039 G>A)* u *FSHR* genu za receptor folikulo-stimulirajućeg hormona, koji dovodi do zamjene asparagina za serin na položaju 680, utječe na funkcionalnost tog receptora te da bi mogao biti presudan za odgovor jajnika na hormonsku stimulaciju. Stoga bi poznavanje genotipa ispitanica za *SNP* Asn^{680}/Ser^{680} *FSHR* gena moglo pridonijeti predikciji odgovora jajnika na hormonsku stimulaciju, što je jedan od preduvjeta uspješnog postupka izvantjelesne oplodnje. Zajedno s biokemijskim parametrima, kao što su koncentracije FSH, LH, E2, progesterona, prolaktina i TSH te broj antralnih folikula i poznavanje genotipa može biti presudno za individualni odgovor pacijentica.

Očekuje se da će rezultati ovog rada pridonijeti procjeni značajnosti *SNP* polimorfizma *Asn680Ser (2039 G>A)* u *FSHR* genu, kao čimbenika odgovora jajnika na hormonsku stimulaciju kod ispitanica uključenih u postupak izvantjelesne oplodnje.

1. 2. CILJEVI RADA

Cilj ovog rada je izvršiti genotipizaciju *SNP* polimorfizma $Asn^{680}Ser$ *(rs6166)* u *FSHR* genu neplodnih albanskih žena iz Dukjagin regije, Republike Kosovo, odnosno, odrediti distribuciju tri moguće genotipske varijante (*Asn680/Asn680, Asn680/Ser680, Ser680/Ser680*), kako bi se utvrdilo sljedeće:

- Kakva je distribucija ovog genotipa u albanskoj ženskoj populaciji iz Dukjagin regije, Republike Kosovo i utječu li na nju socio-kulturne specifičnosti ove populacije.
- Hoće li se genotipske varijante $Asn^{680}Ser$ *(rs6166) FSHR* gena kod albanske populacije uklapati sa dosadašnjim saznanjima o distribuciji tog polimorfizma u ostalim etničkim skupinama Europe.
- Postoji li povezanost polimorfizma *FSHR* gena i rezerve jajnika u žena koje su podvrgnute liječenju neplodnosti metodama medicinski potpomognute oplodnje.

Krajnji cilj je primjeniti ovaj genski biljeg (*SNP* polimorfizam na poziciji $Asn^{680}Ser$ */rs6166/* u genu za FSHR) kao potencijalni rutinski dijagnostički test pri izboru odgovarajućeg protokola za kontroliranu stimulaciju jajnika s individualiziranim pristupom terapije.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Uzroci neplodnosti

Procjenjuje se da je širom svijeta neplodnošću obuhvaćeno oko 10%-15% reproduktivno zrele populacije, odnosno 60-180 milijuna ljudi (Vayena i sur., 2002; Fidler i Bernstein, 1999; van Balen i Inhorn, 2002).

Neplodnost se najčešće definira kao primarna (67-71%) ili sekundarna (29-33%) neplodnost.

Pod primarnom neplodnošću podrazumjevamo izostanak željene trudnoće nakon jedne godine redovitog nezaštićenog spolnog odnosa kod žena mlađih od 35 godina koje ne koriste kontracepciju, a kod žena starijih od 35 godina nakon 6 mjeseci (Pfeifer i sur., 2013).

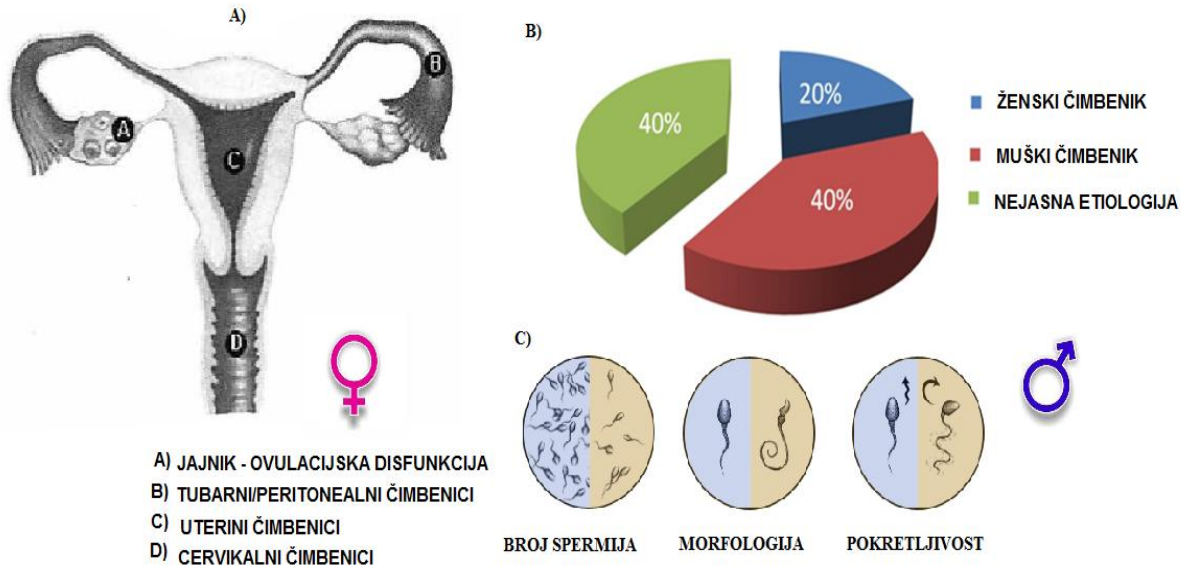
Pod sekundarnom neplodnošću podrazumijevamo situaciju u kojoj roditelji ne uspijevaju dobiti novo dijete nakon 12 mjeseci. Preciznije, sekundarna neplodnost predstavlja se kao nemogućnost majke da nakon što je prethodno rodila jedno ili više djece (pod uvjetom da trudnoće nisu bile rezultat potpomognute medicinske oplodnje) ponovo ostane trudna ili dovede trudnoću do kraja. Sekundarna neplodnost je podjednako učestala kao i primarna neplodnost.

S druge strane učestali gubitak trudnoće je posebno kliničko stanje koje ne spada u neplodnost, a definira se s dvije ili više neuspjelih i klinički (ultrazvuk, histopatološki nalaz) utvrđenih trudnoća.

Procjenjuje se da je oko 40% neplodnosti uzrokovano neplodnošću muškaraca, a 40% neplodnošću žena (Slika 1.B). U otprilike 20 % slučajeva uzrok neplodnosti se nikad ne otkrije i definira se kao neplodnost zbog nepoznatog uzroka - idiopatska neplodnost (Gelbaya i sur., 2014).

U istraživanju koje je provela Svjetska zdravstvena organizacija (*eng. World Health Organization, WHO*) na 8500 neplodnih parova u razvijenim zemljama svijeta, ženski čimbenik neplodnosti uočen je u 37%, muški čimbenik u 8%, a oba čimbenika u 35% neplodnih parova (Weiss i Clapauch, 2014).

Kao najučestaliji čimbenici ženske neplodnosti (Slika 1.A) navode se: ovulacijska disfunkcija uslijed neredovite ovulacije (*oligovulacija*) ili njenog potpunog izostanka (*anovulacija*) (25%), endometrioza (15%), upalne bolesti zdjelice/priraslice (12 %), tubarna- blokada jajovoda (11%), druge nenormalnosti jajovoda (11%) te hiperprolaktinemija (7%) (Weiss i Clapauch, 2014).



Slika 1. Etiologija neplodnosti
Uzroci ženske neplodnosti uključuju ovulacijsku disfunkciju, tubarne/peritonealne čimbenike, uterine čimbenike i cervikalne čimbenike dok uzroci muške neplodnosti najčešće uključuju promjene u broju, morfologiji i pokretljivosti spermija (Preuzeto iz: A) Weiss i Clapauch, 2014; B) http://www.sunflowerhospital.in/definition-and-causes-of-infertility.php; C) http://en.wikinoticia.com/lifestyle/Maternity/117151-causes-of-male-infertility).

Muški čimbenici (Slika 1.C) neplodnosti najčešće uključuju promjene u mobilnost, kvaliteti i brojnosti spermija i ejakulatornu disfunkciju (*oligozoospermija* ≤ 10 milijuna spermija/ml sjemenske tekućine; *asthenozoospermia* ≥ 50% spermija sa slabom pokretljivošću; *teratozoospermia* ≥ 50% spermija s nenormalnom morfologijom; *oligoasthenoteratozoospermia*- prisutna oligozoospermija, asthenozoospermia i teratozoospermia; *azoospermia*- kompletan nedostatak spermija; *aspermija* – ejakulat bez spermija; *nekrospermija*- nevijabilni/mrtvi spermiji; *hematospermija*- prisustvo krvi u ejakulatu; *pyospermia*- bijele krvne stanice prisutne u ejakulatu; *globozoospermia* - spermiji s okruglom glavom). Osim tih anatomskih i fizioloških čimbenika, neplodnost je uzrokovana i učestalošću različitih preventabilnih faktora kao što su infekcija, životne navike, utjecaj okoliša i čimbenici radne sredine te uznapredovala starost pojedinaca (Daar i Merali, 2001; Barazani i sur., 2014; Sharma i sur., 2013; Marsh i Hecker, 2014; Bachir i Jarvi, 2014). Nadalje, plodnost varira unutar različitih populacija i opada sa starošću i kod žena i kod muškaraca (Cheung i sur., 2011).

Utjecaj godina na plodnost izraženiji je kod žena (Howe i sur., 1985). Premda kod muškaraca kvaliteta sperme opada iznad 35. godine života, njihova plodnost se drastičnije smanjuje tek nakon 50. godine života (Dunson i sur., 2004).

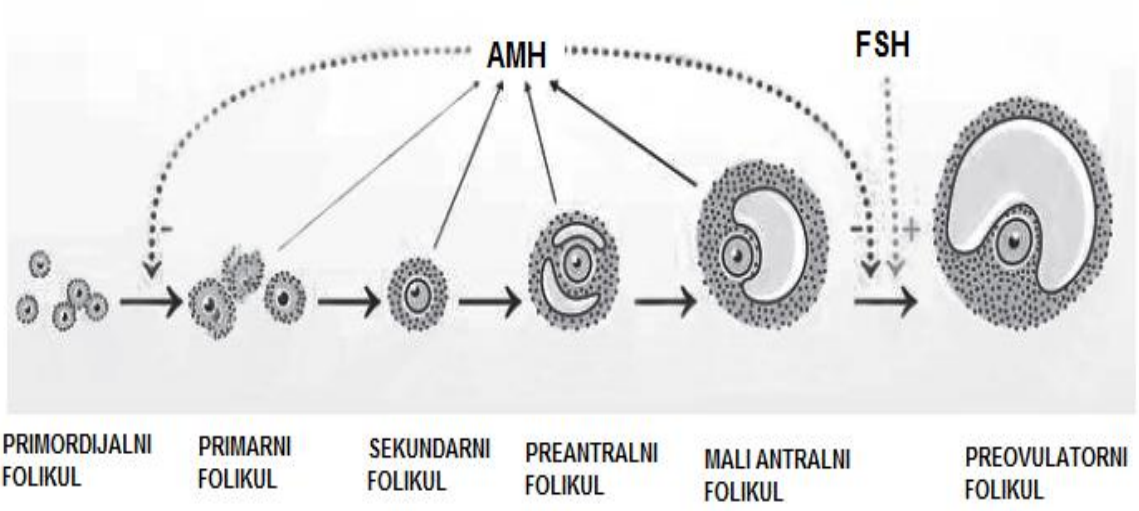
2.1.1. Genetski uzročnici neplodnosti

Posljednjih godina došlo je do naglog razvoja dijagnostičkih metoda, kojima je moguće otkriti genetički uzrok neplodnosti, a to su prije svega kromosomski i genski poremećaji. U kromosomske poremećaje spadaju primjerice Klinefelterov sindrom; Turnerov sindrom (45,X); Down sindrom; 47,XYY; 47,XXX; recipročne translokacije, Robertsonove translokacije u D /13, 14, 15/ i G /21, 22 i Y/ grupi kromosoma, mikrodelecije i inverzije Y kromosoma te mikrodelecije u *AZFa*, *AZFb* i *AZFc* području (*eng. azoospermic factor, AZF*) (Chantot-Bastaraud i sur., 2008; Shah i sur., 2003; Madan, 2012; Rajcan-Separovic, 2012; Pastuszak & Lamb, 2012; Gallego i suradnici, 2014; Hotaling, 2014; Schwartz i sur., 1994)
U genske poremećaje ubrajaju se primjerice pojedinačne mutacije alela gena *KAL1* (*eng. Kallmann syndrome 1 sequence*); mutacije u genima koji kodiraju za β-podjedinicu luteinizirajućeg (LH) i folikul-stimulirajućeg hormona (FSH), mutacije gena za *FSHR* (*eng. follicle stimulating hormone receptor*), *GNRHR* (*eng. gonadotropin-releasing hormone receptor*) *LHCGR/LHR* (*eng. luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor*), *FMR1* (*eng. fragile X mental retardation 1 gene*), *SF1* (*eng. splicing factor 1*), *NR0B1*/*DAX1* (*eng. nuclear receptor subfamily 0, group b, member 1 /dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*), *LEP* (*eng. leptin*), *LEPR* (*eng. leptin receptor*), *KISS1R/GPR54* (*eng. KISS1 Receptor G protein-coupled receptor 54*), *FGFR1* (*eng. fibroblast growth factor receptor 1*) ili multigensko nasljeđivanje (Shah i sur., 2003; Layman, 2013; Ferlin i Foresta, 2014; Montgomery i sur., 2014; Christensen i sur., 1992; de Roux i sur., 1997; Layman i sur., 1998; Aittomäki i sur., 1995; Phillip i sur., 1998; Toledo i sur., 1996; Achermann i sur., 2001; Montague i sur., 1997; Clément i sur., 1998; de Roux i sur., 2003, Seminara i sur., 2003, Dodé i sur., 2001). Pri tome su neki od prethodno navedenih genskih čimbenika povezani specifično s neplodnošću muškaraca ili žena dok neki podjednako utječu na pripadnike oba spola (Phillip i sur., 1998; Ferlin i Foresta, 2014). U ove posljednje svakako spadaju mutacije i polimorfizmi *FSHR* gena koji kodira aminokiselinski redoslijed staničnog receptora za folikulo-stimulirajući hormon (Aittomäki i sur., 1995; Desai i sur., 2013).

2.1.2. Oogeneza

Oogeneza kod žena započinje u 3. tjednu nakon oplodnje. Primordijalne germinativne stanice (PGS), nastale u žumančanoj vrećici, migriraju ameboidnim gibanjem niz stražnje crijevo do genitalnog grebena, koji nastaje između 3.5-4. tjedna trudnoće, i za cijelo to vrijeme prolaze kroz ubrzane mitotske diobe, nakon čega slijedi kolonizacija gonada te daljnja diferencijacija u oogonije koje se nastavljaju dijeliti mitozom, povećavajući tako količinu germinativnih stanica. Nakon 8. tjedna trudnoće njihov broj dosiže 60 000, da bi se do 20. tjedna povećao za oko 10 puta. Folikulogeneza započinje u 16.-18. tjednu trudnoće, stvaranjem primordijalnih folikula. Nakon toga oogonije postaju primarne oocite te se dalje dijele mejozom (Sánchez i Smitz, 2012; Fujimoto i sur., 2013; Gondos i sur., 1971; Gondos i suradnici, 1986; Witschi, 1948). Okolne mezenhimske stanice stvaraju bazalnu membranu i granuloza stanice. U 4. i 5. mjesecu trudnoće broj oocita u jajniku doseže svoj maksimum, od oko 5-8 milijuna, a nakon toga njihov broj se drastično smanjuje. Prilikom poroda broj oocita iznosi oko 1-2 milijuna te dalje nastavlja s padom do puberteta kada njihov broj iznosi oko 500 000 (Baker, 1963). Primordijalni folikuli ostaju cijelo vrijeme u mirujućem stanju (diploten u profazi I mejotske diobe) i tek se manji broj njih oslobađa u slijedećih 35-40 godina reproduktivne zrelosti žene, do nastupanja menopauze (Gougeon, 1996; Hardy i sur., 2000; Hansen i sur., 2008; Sánchez i Smitz, 2012). Tijekom tog razdoblja primordijalni folikuli periodično napuštaju mirujuće stanje i ulaze u skupinu rastućih folikula koji u nedostatku FSH hormona ulaze u atreziju. Čak više od 90 % folikula završava svoj životni vijek apoptozom odnosno programiranom smrću stanica, a da nikada ne postignu mejotsku kompetentnost. Tek nakon puberteta, odnosno aktivacije povratne sprege hipotalamus-hipofiza-jajnik tijekom folikularne faze, povećana koncentracija FSH spašava rastuće folikule od atrezije koji zatim parakrinom signalizacijom jajnika odnosno tzv. primarnim odabirom bivaju inducirani na kontinuirani rast (McGee i Hsueh, 2000; Zeleznik, 2004). Proces odabira odvija se relativno kontinuiranim intenzitetom tijekom prve tri dekade života, uz istovremeno ubrzanje procesa atrezije odnosno gubitka ne-rastućih folikula. Kao posljedica toga dolazi do gubitka ovarijske rezerve i smanjenog fekunditeta u tridesetoj godini te njegovog uočljivog pada nakon 36. godine života (Sánchez i Smitz, 2012). Uz diferencijaciju i rast oocita najvažniji događaj u sazrijevanju primarnog folikula predstavlja ekspresija receptora folikulo-stimulirajućeg hormona (FSHR) (beta granulozne stanice stimulirane s FSH, TGF, aktivinom i cAMP) koji je potreban za nastavak razvoja u preantralno stanje. S druge pak strane ekspresija anti-Mullerovog hormona (AMH, član TGF beta obitelji) u granuloznim stanicama primarnih, sekundarnih, preantralnih i malih

antralnih folikula, koji se luči u cirkulaciju od puberteta do menopauze, neophodna je za održavanje balansa između broja aktiviranih primordijalnih folikula i onih koji ostaju u stanju mirovanja (Oktem i Oktay, 2008; Grynnerup i sur., 2012; Rajpert-De Meyts i sur., 1999). AMH u jajniku ima dvojaku funkciju. S jedne strane inhibira inicijalni odabir primarnih folikula iz mirujućih primordijalnih folikula, a s druge inhibira senzitivnost antralnih folikula (i njihovu regrutaciju) na FSH tijekom menstrualnog ciklusa, sprečavajući tako preuranjeno smanjenje broja primordijalnih folikula (Slika 2.). AMH je produkt granuloznih stanica malih antralnih i preantralnih folikula i kao takav odražava njihovu brojnost. Zbog toga koncentracija AMH u krvi služi kao mjera ovarijske rezerve odnosno mjera broja i kvalitete preostalih primordijalnih folikula kod žena podvrgnutih potpomognutoj medicinskoj oplodnji (Grynnerup i sur., 2012; Anderson i sur., 2012; Grynnerup i sur., 2014).



Slika 2. Uloga anti-Mullerovog hormona (AMH) u folikulogenezi
AMH u jajniku ima dvojaku funkciju. AMH inhibira inicijalni odabir primarnih folikula iz mirujućih primordijalnih folikula. Osim toga AMH inhibira senzitivnost antralnih folikula na FSH tijekom menstrualnog ciklusa, sprečavajući tako preuranjeno smanjenje broja primordijalnih folikula. **AMH**- anti-Mullerov hormon; **FSH**- folikul-stimulirajući hormom (Preuzeto iz: Grynnerup i sur., 2014).

Primarni folikuli prelaze postupno u sekundarne i antralne (Graafove) folikule. Eventualno jedan od tih folikula biva odabran i postaje dominantni folikul oslobađajući na kraju zrelu jajnu stanicu nakon djelovanja povećane koncentracije luteinizirajućeg hormona- LH. U svakom menstrualnom ciklusu žene dominantni folikul proistječe iz primarnog folikula koji je odabran gotovo godinu dana prije. Folikulogeneza je izrazito dug proces koji se u osnovi

može podijeliti u dvije sukcesivne faze. Prva, takozvana preantralna ili gonadotropin neovisna faza, karakterizirana je rastom i diferencijacijom oocita, koja je uglavnom pod kontrolom lokalno proizvedenih faktora rasta, odnosno autokrine/parakrine signalizacije. Neki od ključnih molekularnih čimbenika uključenih u regulaciju oogeneze i folikulogeneze prikazani su u tablici 1. i slici 3.

Preantralna faza može se podijeliti u tri glavna stadija: stvaranje primordijalnog, primarnog i sekundarnog folikula. Sam proces od primordijalnog do potpuno zrelog sekundarnog folikula odvija se tijekom 290 dana, odnosno 10 redovitih menstrualnih ciklusa.

U drugoj, antralnoj i gonadotropin ovisnoj (FSH, LH i faktori rasta) fazi dolazi do izrazitog rasta (i do 25-30 mm) samog folikula. Antralna faza sazrijevanja folikula obično se dijeli u četiri stadija: mali (stadij 2, 3, 4 i 5), srednji (6), veliki (7) i preovulatorni (8) Graafov folikul (Slika 4.). Rast folikula ubrzava se nakon stvaranja antruma (stadij 3) te od tog momenta do stvaranja preovulatornog folikula prođe oko 60 dana, odnosno dva menstrualna ciklusa. Dominantni folikul odabire se iz skupine folikula u stadiju 5 pri kraju lutealne faze ciklusa i od tada pa do stvaranja zrelog preovulatornog folikula prođe oko 15–20 dana (Slika 3.).

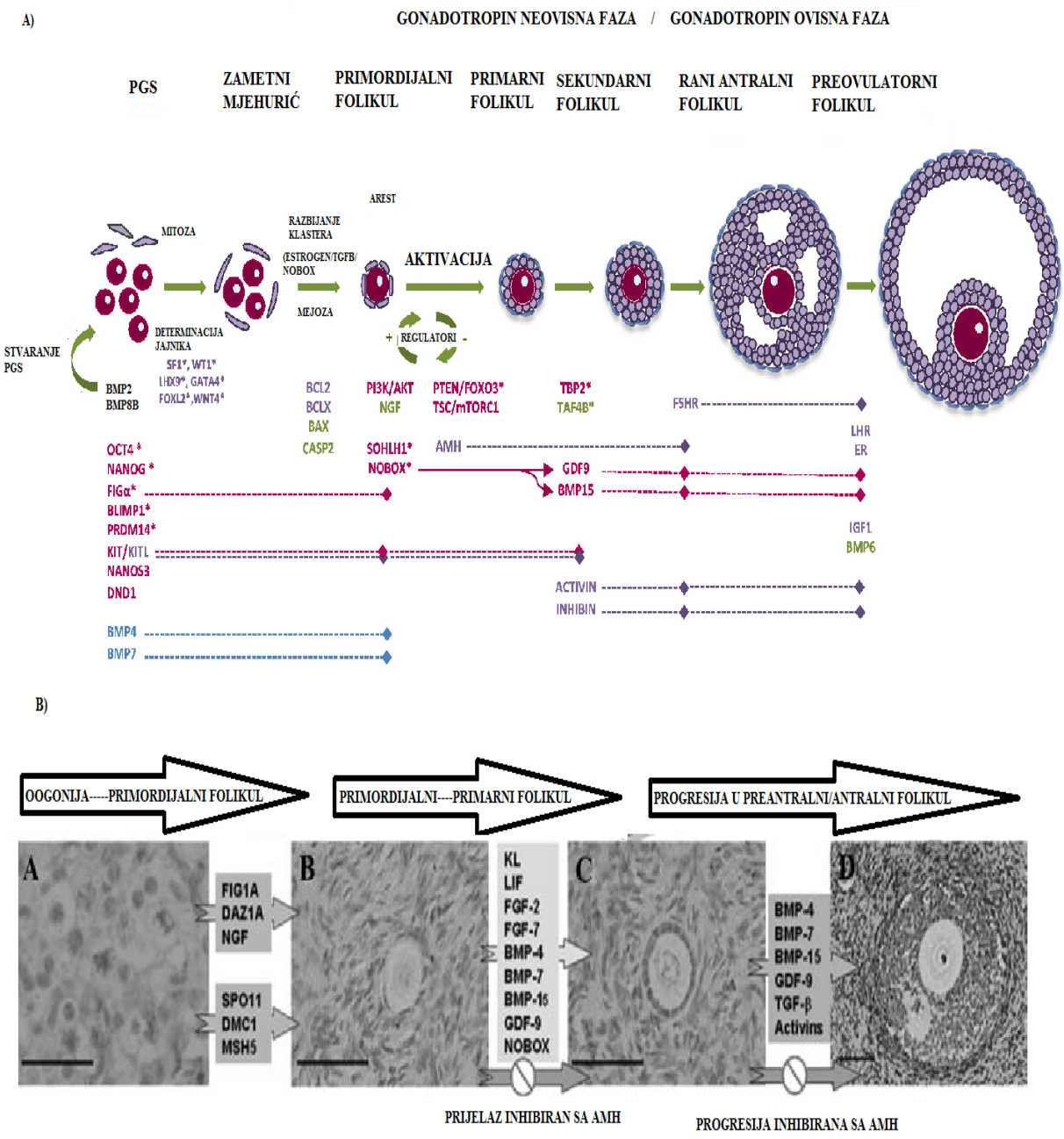
Do atrezije folikula (počinje apoptozom granuloznih stanica nakon čega dolazi do apoptoze oocita) dolazi nakon formiranja sekundarnog folikula (stadij 1), a najveći stupanj atrezije odvija se tijekom formiranja malog i srednjeg Graafovog folikula (stadij 5, 6 i 7) (Slika 4. i Slika 5.).

Mehanizam odabira dominantnog folikula uključuje porast koncentracije FSH u plazmi i njegovo nakupljanje u folikularnoj tekućini. Za vrijeme menstrualnog ciklusa drugi val porasta koncentracije FSH događa se nekoliko dana prije pada plazmatskog progesterona na bazalnu razinu, pri kraju lutealne faze. Koncentracija FSH ostaje povećana tijekom prvog tjedna folikularne faze ciklusa i neophodna je za proces odabira dominantnog folikula i fertilitet, a glavni uzrok sekundarnog rasta koncentracije FSH predstavljaju smanjena proizvodnja estradiola i inhibina A u žutom tijelu (*corpus luteum*). Primarni mehanizam kojim FSH stimulira selekciju dominantnog folikula predstavlja stimulacija FSHR signalnog puta u granuloznim stanicama folikula (primjerice aktivacija PI3K/fosfatidil inozitol 3 kinaza/ signalnog puta- stimulacija fosforilacije Akt /protein kinaze B- porast koncentracije inhibitora apoptoze /IAP proteini/). Razvoj folikula iz preantralnog u rani antralni folikul ovisi uglavnom o autokrinoj/parakrinoj signalizaciji unutar jajnika no u ovoj fazi dolazi i do ekspresije receptora za FSH i LH i prelaska u gonadotropin ovisnu fazu razvoja.

Tablica 1. Prikaz ključnih molekularni čimbenika oogeneze i folikulogeneze

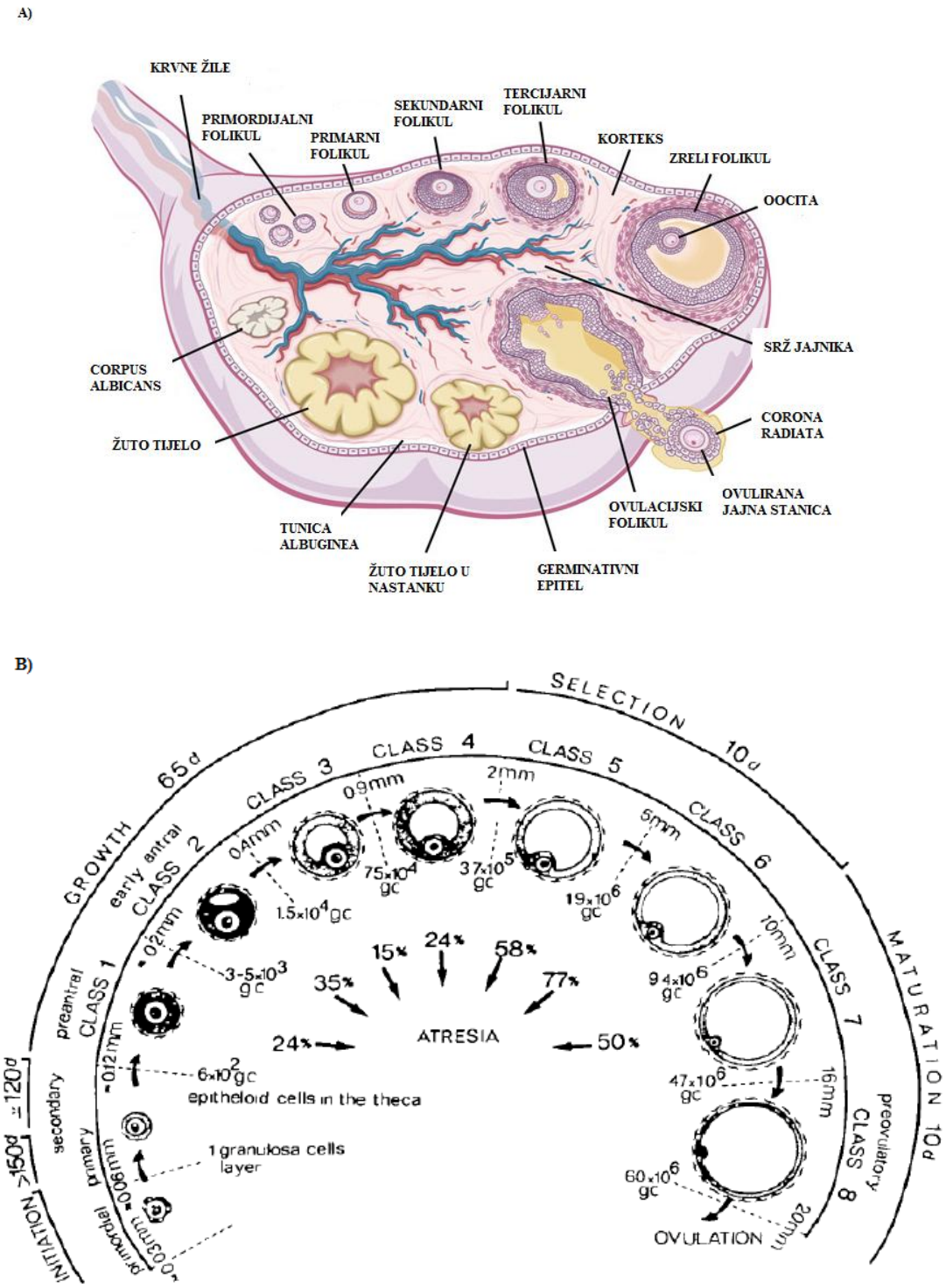
RAZVOJNI STADIJ	KLJUČNI REGULATORI
PMS primordijalne zametne stanice	
• 3 tjedna pc/post coitus	BMP4, BMP8b
• Formacija	c-KIT, SCF
• Migracija i proliferacija	
• Koloniziranje gameta	
• Post-migracijsko preživljavanje	
Oogonije	
• proliferacija mitozom	
Oocite- mejoza profaza I	cAMP
• Preleptotene: replikacija DNA	
• Leptoten: početak homolognog sparivanja kromosoma	
• Zigoten	
° homologno sparivanje	
° Sinapse	
• Pahiten	
° *Crossing over*	
° Rekombinacija	
° DNA popravak	
• Diploten: mejotski arest	cAMP
Primordijalni folikul	Aktivini, AMH, TGF β ,
• 16–18 tjedan pc	BMP, inzulin, estrogen,
• Diploten-arest -oocite	androgeni, c-KIT
• jedan sloj granuloznih stanica	
Primarni folikul	Aktivini, AMH
• kuboidalni sloj granuloznih stanica	
Pre-antral sekundarni folikul	Aktivini, Inhibini, AMH,
• Kasna folikulogeneza	
• Proliferacija granuloznih stanica	GDF-9, BMP-15
• Theca prekursor - formacija	
Antral/Graffov folikul	Inhibins, AMH, cAMP,
• Stvaranje antruma	FSH/FSH receptor, LH/LH receptor
• stvaranje preovulatornog folikula i žutog tijela corpus luteum	
Ekspanzija cumulusa	LH signaling, PGE2
Nastavak mejoze	MPF
Ovulacija	COX2, LH
Sazrijevanje oocite i oplodnja	Ca^{2+}

Legenda: AMH- anti-Mullerov hormon; **cAMP**- ciklički adenozinmonofosfat; **c-KIT**-CD117 antigen (*engl. v-kit hardy-zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog)*; **COX2**- ciklooksigenaza 2; **BMP 4/8b**- koštani morfogenetski protein 4/8b; **GDF**- diferencijacijski faktor rasta; **FSH**- folikulo-stimulirajući hormon; **LH**- luteinizirajući hormon; **MPF**- *eng. M phase promoting factor*; **SCF**- faktor matičnih stanica; **pc**- post coitus; **PGE2**- prostaglandin E2; **TGFβ**- transformirajući čimbenik rasta beta (Preuzeto iz: Desai i sur., 2013).



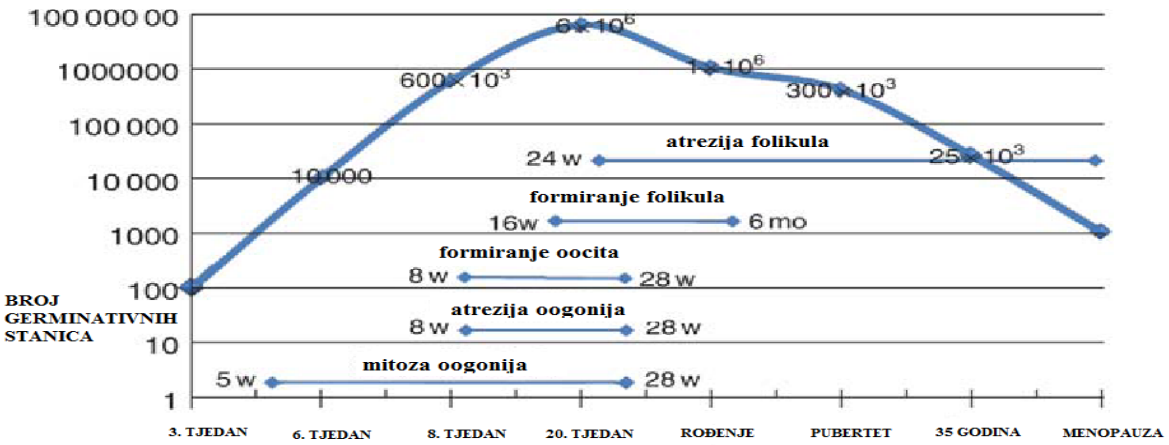
Slika 3. Prikaz ključnih molekularnih čimbenika uključenih u stvaranje primordijalnih zametnih stanica, oogenezu i folikulogenezu

A) Molekularni čimbenici uključeni u stvaranje primordijalnih zametnih stanica, oogenezu i folikulogenezu (Preuzeto iz: Sánchez i Smitz, 2012). B) Molekularni čimbenici uključeni u folikulogenezu- od stadija primordijalnog folikula do preantralnog/antralnog stadija. A - oogonija**;** B – primordijalni folikul, C – primarni folikul, D- rani antralni folikul (Preuzeto iz: Oktem i Oktay 2008).



Slika 4. Shematski prikaz jajnika s kronološkim rasporedom folikulogeneze

A) Shematski prikaz folikulogeneze i oogeneze u jajniku (Preuzeto iz: Desai i sur., 2013). B) kronološki prikaz oogeneze i folikulogeneze (Preuzeto iz: Erickson i Shimasaki, 2001).



Slika 5. Grafički prikaz oogeneze i folikulogeneze tijekom života
Kad formiraju nakupinu od 100 stanica zametne stanice uleze u migracij, proliferaciju i kolonizaciju budućih gonada. Njihov broj se dramatično povećava eksponencijalnim rastom od 600 000 u 8 tijednu do 6–7 milona u 20 tijednu trudnoće. Od tada njihov broj progresivno opada procesom atrezije. Zbog čega milioni zametnih stanica bivaju izgubljeni dok samo njih 300–400 (<1%) bivaju odabrani za ovulaciju i dalje predstavlja jednu od najvećih zagonetki reproduktivne biologije (Preuzeto iz: Oktem i Urman, 2010).

2.1.3. Hormonalna regulacija reprodukcije

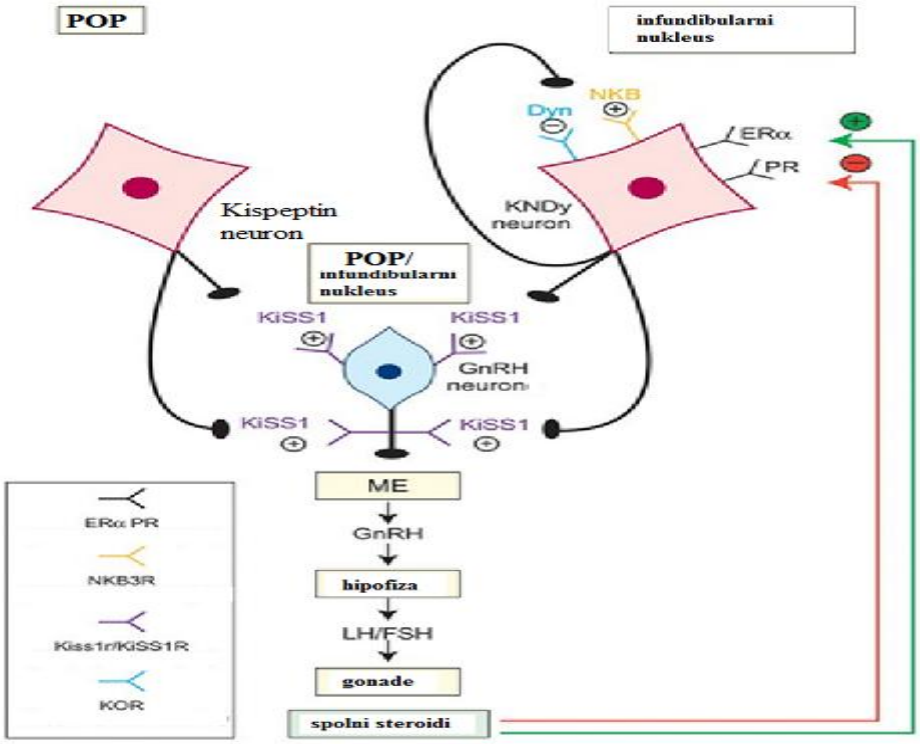
Menstrualni ciklus može se u osnovi podijeliti u tri faze: proliferativnu fazu (folikulogeneza), ovulaciju i sekretornu/lutealnu fazu. Kod većine žena ciklus traje oko 25-30 dana, odnosno 28 dana u prosjeku, a varijabilnost u njegovom trajanju ovisi u prvom redu o trajanju folikularne faze dok je lutealna faza ciklusa konstantna i kod većine žena traje 14 dana. Regulacija menstrualnog ciklusa te stvaranje optimalnih uvjeta za implantaciju oplođene jajne stanice odvija se pod kontrolom povratne sprege između hormona hipotalamusa, hipofize i jajnika (Tablica 2.)

Inicijalni signal za početak menstrualnog ciklusa dolazi iz centralnog živčanog sustava odnosno infundibularne/arkuatne jezgre hipotalamusa koja luči gonadotropin oslobađajući hormon (*eng. gonadotropin-releasing hormone,* GnRH; (GnRH-I /regulira sintezu, skladištenje i sekreciju FSH i LH/, GnRH-II, GnRH-III)) koji zatim modulira aktivnost gonadotropa anteriornog režnja hipofize i dovodi do oslobađanja folikul-stimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg (LH) hormona (Seeburg i suradnici 1987; Vale i suradnici 1977). GnRH neuroni šire se iz preoptičkog područja kroz infundibularni nukleus i svojim aksonima završavaju u eminenciji medijani, gdje se vrši koordinirano pulsirajuće oslobađanje

Tablica 2. Ključni hormoni povratne sprege hipotalamus-hipofiza-jajnik

hormon	struktura	lokus	glavno mjesto sinteze	½ trajanja	koncentracija u serumu
GnRHI	Dekapeptid	8p21–8p11.2	arkuatna jezgra hipotalamusa	2–4 minute	
FSH	Glikoprotein α-podjedinica β -podjedinica	a : 6q12.21 b : 11p13	gonadotropi anteriorne hipofize	1.5–4 h	5–25 mIU/mL
LH	Glikoprotein α-podjedinica β -podjedinica	a : 6q12.21 b : 19q12.32	gonadotropi anteriorne hipofize	20–30 minute	5–25 mIU/mL
E2	18C steroid		granulozne stanice folikula	2–3 h	20–400 pg/mL
Progesteron	21C steroid		Theca-lutein stanice	5 minute	0.1–30 ng/mL
Inhibin	Peptid sa α-i β -podjedinicom Inhibin A = α + β A Inhibin B = α + β B	a : 2q33 β A: 2q13 α B: 7p15	granulozne stanice folikula	30–60 minute	A: 10–60 B: 10–150 pg/mL

Legenda: GnRH1- gonadotropin oslobađajući hormon 1; **E2-** estradiol; **LH-** luteinizirajući hormon; **FSH-** folikul-stimulirajući hormon; **18C/21C-** broj ugljikovih atoma **(**Preuzeto iz: Mahutte i Ouhilal, 2007).



Slika 6. Shematski prikaz Kispeptin-GnRH signalnog puta

POP- preoptičko područje; **ERα-** estrogen receptor alfa; **ErαPR-** spolni steroidni receptori; **Dyn-** dynorphin;GnRH- **Kiss1/KiSS1-** kispeptin; **Kiss1r/KiSS1R-** kispetin receptori; **KOR-** kapa opioid peptid receptor; **ME-** mediana eminencija; **NKB-** neurokinin B; **NKB3R-** neurokinin B receptori; **PR-** progesteronski receptor **(**Preuzeto iz: Skorupskaite i sur., 2014).

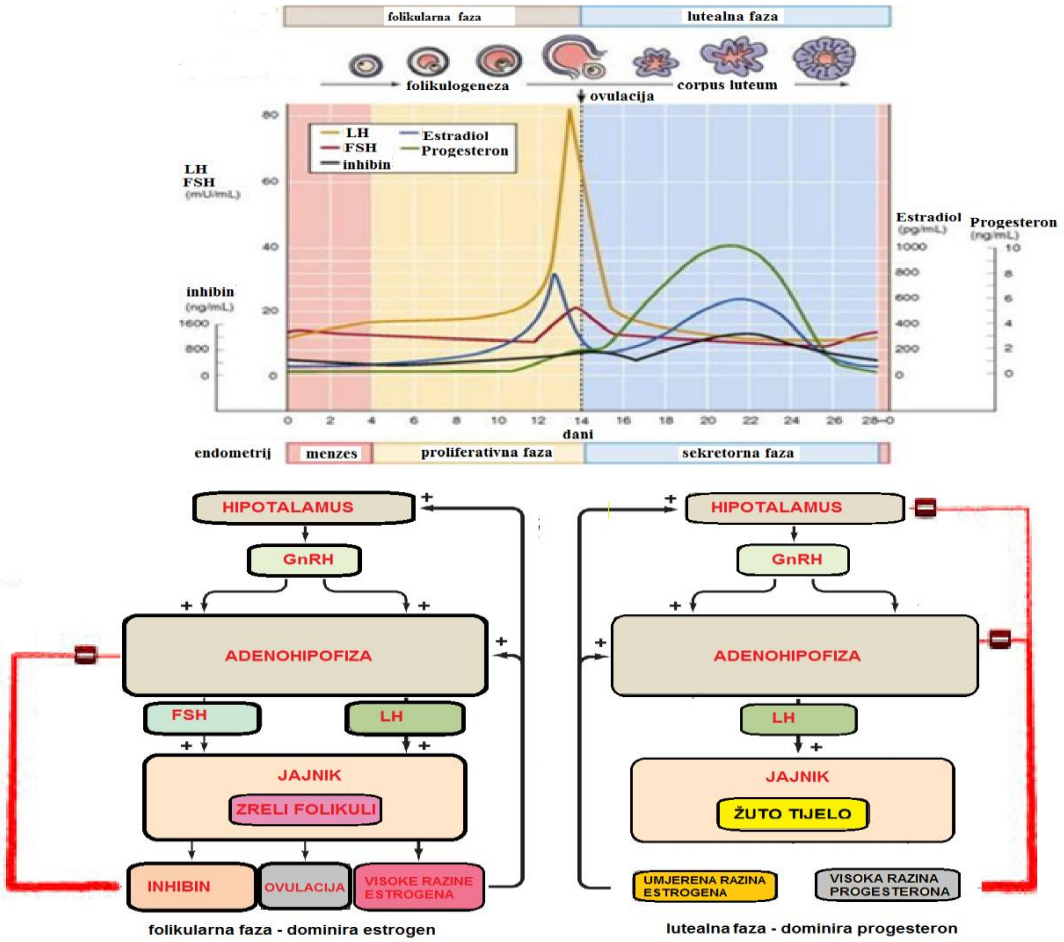
GnRH u portalnu cirkulaciju hipofize pod utjecajem kispeptin i KNDy (neurokinin B i dinorfin) neurona.Kispeptin neuroni iskazuju spolni dimorfizam pa žene imaju znatno više tih neurona u infundibularnom nukleusu i ventralnoj periventrikularnoj zoni hipotalamusa u odnosu na muškarce. Nadalje, stimulacija Kispeptin-GnRH signalnog puta ovisna je o spolnim steroidima te na taj način kispeptin neuroni sudjeluju u negativnoj i pozitivnoj povratnoj sprezi (Slika 6.). Pulsirajuće oslobađanje GnRH ovisi o fazi menstrualnog ciklusa, a stimulirano je naglim porastom koncentracije estradiola u krvnoj plazmi. Progesteron također sudjeluje u regulaciji GnRH (Skorupskaite i sur., 2014).

U ranoj fazi estrusa razina estradiola je niska i rezultira inhibicijom GnRH (Beshay i Bruce, 2013; Christensen i sur., 2012). Nagli porasta koncentracije estradiola u proestrusu dovodi do ekspresije progesteronskih receptora na membrani GnRH neurona, aktivacije metabotropnih glutaminskih receptora tipa Ia na astrocitnim neuronima i ubrzanog stvaranja neuroprogesterona koji stimulira kispeptinske neurone na oslobađanje, što zatim stimulira aktivnost GnRH neurona i oslobađanje GnRH u anteriornom režnju hipofize, a to pak ima za posljedicu oslobađanje hormona LH i FSH (Beshay i Bruce, 2013; Christensen i sur., 2012). Kallmanov sindrom (hipogonadotropni hipogonadizam) karakteriziran je nedostatkom GnRH, što ima za posljedicu neadekvatni razvoj sekundarnih spolnih karakteristika, a ulazak u pubertet odgođen je ili u potpunosti izostane.

FSH i LH hormoni se također izlučuju skokovito, a amplituda njihovog izlučivanja ovisi o pulsirajućoj aktivnosti GnRH te o koncentraciji progesterona i estradiola (Slika 7.). U prvom dijelu menstruacijskog ciklusa prevladava FSH (folikularna faza) dok u drugom dijelu, odnosno lutealnoj fazi ciklusa, prevladava LH (Beshay i Bruce, 2013; Christensen i suradnici, 2012). Hormoni LH i FSH reguliraju ključne aspekte reprodukcije u jajniku, uključujući steroidogenezu, gametogenezu i ovulaciju (Burns i Matzuk, 2002).

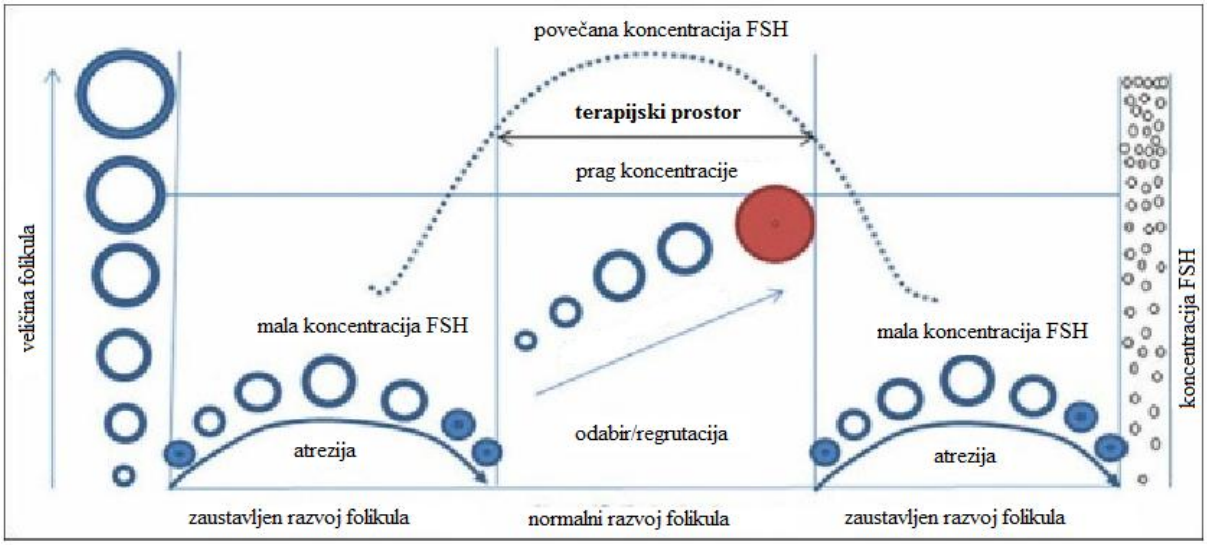
Oba hormona su heterodimerne molekule građene od jedne zajedničke alfa podjedinice koja dimerizira s hormon specifičnom beta podjedinicom (LHβ i FSHβ), čija sinteza predstavlja ograničavajući korak u brzini sinteze oba hormona (Pierce i Parsons, 1981; Kaiser i sur., 1997; Papavasiliou i sur., 1986). Sintezu FSHβ podjedinice, uz GnRH, stimuliraju i aktivini. Koncentracija FSH u krvi počinje rasti nekoliko dana prije menstruacije. Osim što dovodi do inicijalnogodabira i rasta folikula te odabira dominantnog folikula FSH također stimulira rast granuloznih stanica jajnika i aktivnost enzima aromataze koja vrši konverziju androgena u estrogene. Rastuća koncentracija FSH u krvnoj plazmi mora prijeći određeni koncentracijski prag (Slika 8.) kako bi inducirala finalnu gonadotropin-ovisnu fazu rasta folikula (Raju i suradnici, 2013). Tijekom te faze stvara se rastuća koncentracija estradiola koja mehanizmom

negativne povratne sprege inhibira lučenje FSH, što dovodi do izrazitog pada njegove koncentracije ispod aktivnog koncentracijskog praga (Beshay i Bruce, 2013). No unatoč padu koncentracije FSH, dominantni folikul nastavlja s rastom i povećanom ekspresijom FSHR proteina, što ga čini otpornim na pad FSH koncentracije. S druge strane, pad koncentracijeFSH doprinosi androgenim uvjetima u nedominantnim folikulima. Nakon ovulacije dominantnog folikula dolazi do izrazitog pada u koncentraciji FSH. Funkcionalni koncentracijski prag FSH za pojedine folikule nije stalan već ovisi razvojnom stadiju i varira tijekom vremena. U pojedinoj fazi folikuli iskazuju različitu osjetljivost na FSH. Najveća potreba za FSH je u ranom antralnom stadiju i pada tijekom kasnog antralnog stadija dok folikul s najvećom osjetljivošću na FSH na kraju tog procesa postaje dominantni folikul (Raju i sur., 2013; Sullivan i sur., 1999; Fauser i sur., 1998).



Slika 7. Promjene koncentracije spolnih hormona tijekom menstruacijskog ciklusa i mehanizam povratne sprege

Gornji dio slike prikazuje promjene koncentracije LH, FSH, progesterona, inhibina i estradiola u krvnoj plazmi tijekom menstruacijskog ciklusa. Na donjoj slici prikazan je mehanizam povratne sprege u sustavu hipotalamus-adenohipofiza-jajnik tijekom folikularne i lutealne faze menstrualnog ciklusa.



Slika 8. Shematski prikaz koncentracijskog praga FSH i terapijskog prostora za gonadotropinsku stimulaciju jajnika u metodama potpomognute oplodnje
Rastuća koncentracija FSH mora prijeći određeni koncentracijski prag kako bi inducirala finalnu gonadotropin-ovisnu fazu rasta folikula **(**Preuzeto iz: Raju i sur., 2013.).

Koncentracija LH u krvnoj plazmi također raste prije početka menstruacije. S obzirom na kraći poluvijek raspada, LH se mora brzo sintetizirati i ima pulseve s većom amplitudom od onih za FSH hormon (Tablica 3).

Porast koncentracije LH hormona tijekom folikularne faze je polagan a neposredno pred ovulaciju dolazi do naglog porasta LH, kao odgovor na pozitivnu povratnu spregu uzrokovanu stvaranjem estradiola u dominantnom folikulu (Beshay i Bruce, 2013).

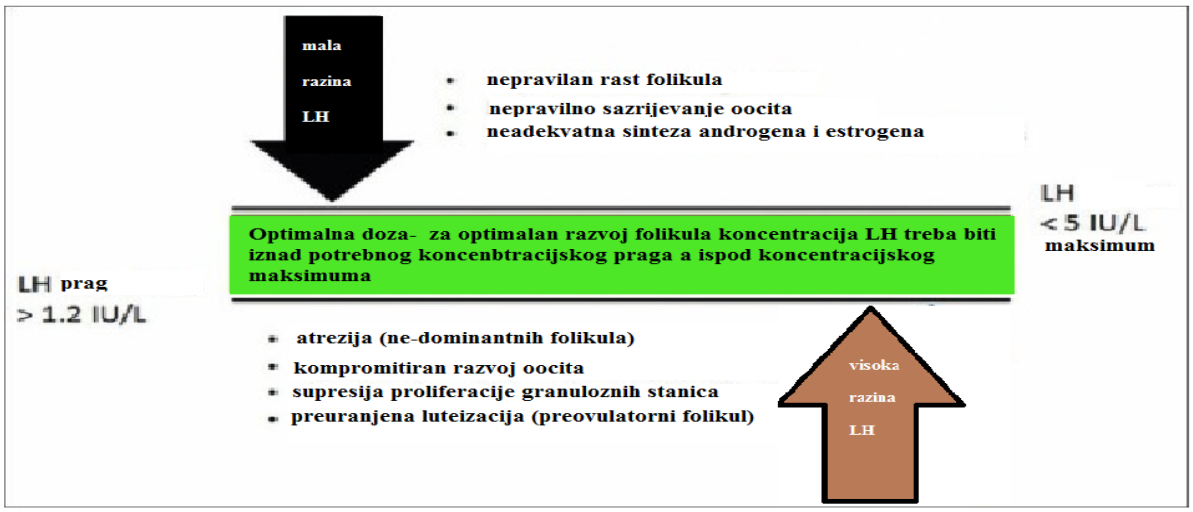
Tablica 3. Varijacije u frekvenciji i amplitudi lučenja LH hormona tijekom menstrualnog ciklusa (Preuzeto iz: Mahutte i Ouhilal, 2007).

Faza menstrualnog ciklusa	srednja frekvencija (minuta)	srednja amplituda (mIU/mL)
rana folikularna faza	90	6.5
srednja folikularna faza	50	5
kasna folikularna faza	60–70	7
rana lutealna faza	100	15
srednja lutealna faza	150	12
kasna lutealna faza	200	8

Premda je u metodama potpomognute medicinske oplodnje administracija endogenog FSH sama po sebi dovoljna za indukciju folikularnog rasta, čini se da su određene doze LH ipak neophodne za optimalan razvoj folikula, jer u suprotnom dolazi do abnormalno smanjene

proizvodnje estradiola i gubitka sposobnosti luteinizacije i rupcije folikula nakon hCG stimulacije (Loumaye i sur., 2003). Drugi razlog tomu moguće leži u činjenici da FSH, potičući konverziju kolesterola u steroide, stimulira proizvodnju progesterona (Bosch i sur., 2003; Bosch i sur., 2010; Filicori i sur., 2002; Palermo, 2002; Voutilainen i sur., 1986). Rano izlaganje progesteronu može ubrzati rast endometrija, dovodeći do asihronije između razvojnog stadija embrija i endometrija, umanjujući time šansu za uspješnu implantaciju.

LH stimulira konverziju progesterona u androgene koji se dalje mogu prevesti u estrogene te dodatak LH može povoljno utjecati na endometrij, povećavajući tako šanse za implantaciju embrija i uspješnost kliničke trudnoće (Raju i sur., 2012). Prema nedavno objavljenim studijama, indikaciju za dodatak LH predstavljaju: smanjeni odgovor na GnRH agonist u 6 dana dugom protokolu, neprisutnost folikula > 10 mm, E2 < 200 pg/ml, debljina endometrija < 6 mm i bazalna razina serumskog LH < 1.2 IU/ml 6. dana, te poodmakla dob pacijentica (O'Dea i sur., 2008; Raju i sur., 2012; Hill i sur., 2012). Terapijski prostor za administraciju LH prikazan je na slici 9.



Slika 9. Shematski prikaz terapijskog prostora za LH

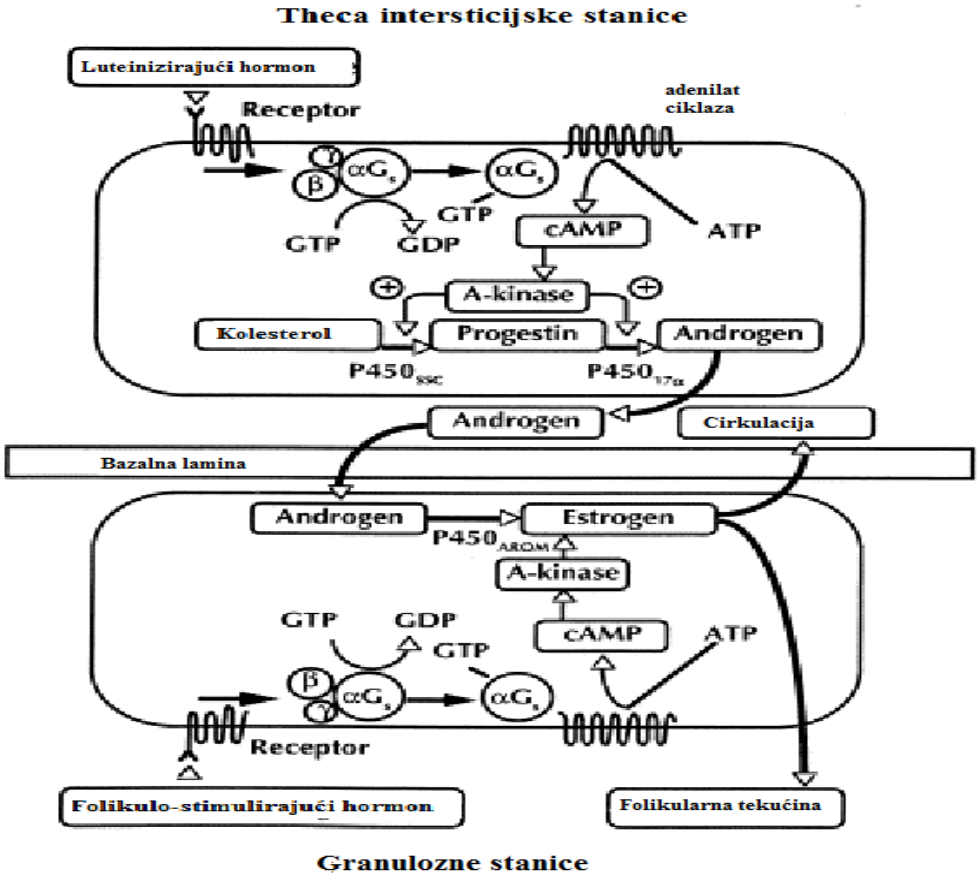
Za optimalni razvoj folikula koncentracija LH hormona mora biti iznad potrebnog koncentracijskog praga a ispod njenog maksimuma (Preuzeto iz: Raju i sur., 2013).

FSH i LH hormoni vrše svoju staničnu aktivnost djelujući na specifične receptore (FSHR i LHR), s tim da se FSHR proteini nalaze isključivo na membranama granuloznih stanica, a LHR na teka stanicama.

U prisutnosti estradiola FSH inducira ekspresiju LHR na granuloznim stanicama. LHR na granuloznim stanicama neophodan je da bi LH/hCG inducirali ovulaciju i luteinizaciju. Aktivacija LHR receptora u teka stanicama u prvom redu stimulira stvaranje androstenodiona

koji se zatim transportira u granulozne stanice, gdje biva aromatiziran u estron i konvertiran u estradiol (Slika 10.).

Ove dvije vrste stanica su glavna mjesta proizvodnje steroidnih hormona u jajnicima, s tim da se androgeni proizvode u teka stanicama (androstenedion, DHEA, testosteron), a estrogeni u granuloznim stanicama (estradiol, estron, inhibin, AMH). Teka-lutein stanice su odgovorne za proizvodnju progesterona (progesteron, 17-hidroksi progesterona) dok se estradiol i estron proizvode i u granuloza-lutein stanicama ovarija.



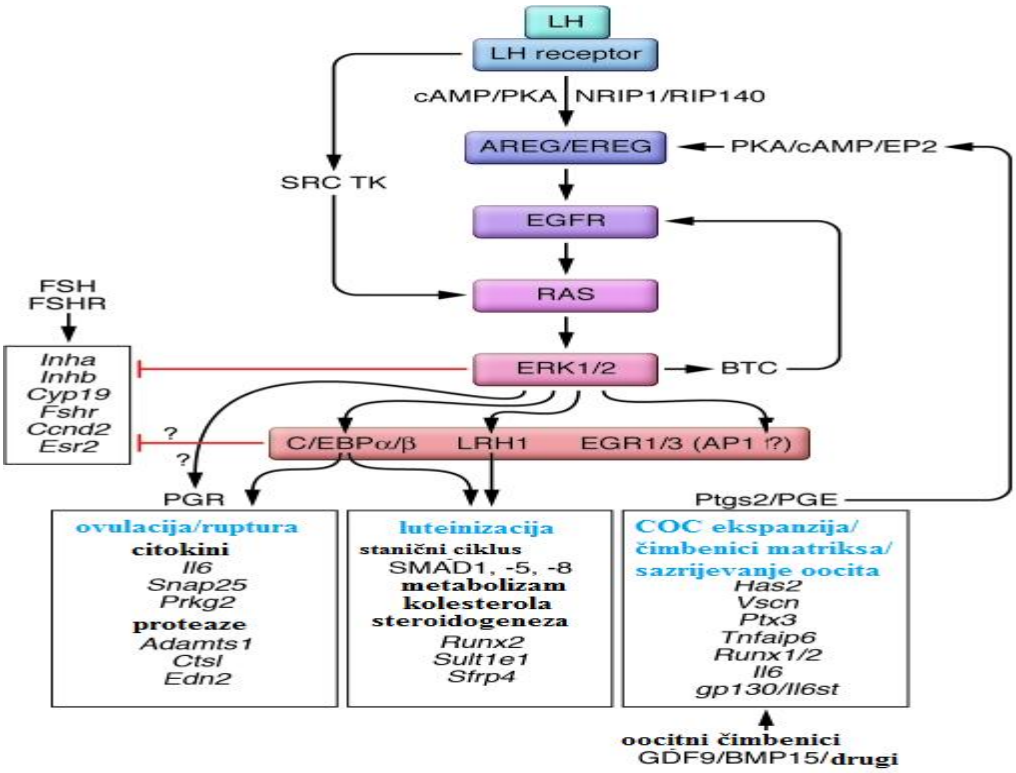
Slika 10. Utjecaj FSH i LH na stvaranje steroidnih hormona u jajniku

Slika ilustrira mehanizam stvaranja estradiola u folikulima jajnika poznat u stručnim krugovima kao koncept „dva gonadotropina-dvije stanice“ (*eng. the two gonadotropin-two cell concept*) **(**Preuzeto iz: Erickson i Shimasaki, 2001).

Kako je proizvodnja estradiola (E2) karakteristična za dominantne folikule, praćenje njegove koncentracije u serumu predstavlja važan marker za kontrolu fiziološkog odgovora žene na endogeno ili egzogeno aplicirane gonadotropine. Nakon što je došlo do ovulacije, dominantni folikul prelazi u žuto tijelo, *corpus luteum,* koje luči značajne količine progesterona i estradiola koji djeluju na endometrij i promoviraju trudnoću *(*Erickson i Shimasaki, 2001). Važna uloga LH u funkcioniranju dominantnog folikula i žutog tijela vide se ne samo u

činjenici što je ovulatorna doza LH/hCG neophodna za ovulaciju i luteinizaciju već i u tome što je LH/hCG neophodan za proizvodnju progesterona i estradiola za vrijeme rane i srednje lutealne faze menstrualnog ciklusa. Osim toga, hCG je neophodan za transformaciju žutog tijela iz menstrualnog ciklusa u trudnoću.

LH je također izrazito bitan za sazrijevanje jajnih stanica, odnosno njihovo pripremanje za nastavak mejoze (Slika 11.).



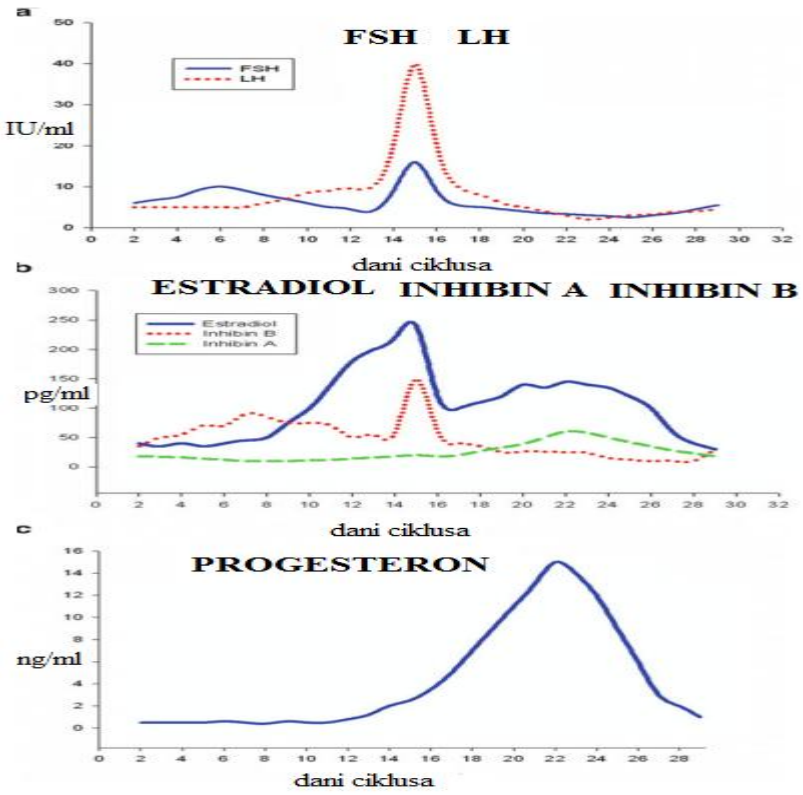
Slika 11. Shematski prikaz nekih molekularnih interakcija induciranih LH hormonom tijekom ovulacije i luteinizacije

LH vezanjem za svoje receptore na površini stanice dovodi do aktivacije signalnih puteva koji između ostalog rezultiraju ovulacijom/rupturom, luteinizacijom, ekspanzijom COC (*eng. cumulus cell oocyte complex***)** kompleksa i sazrijevanjem jajnih stanica **(**Preuzeto iz: Richards i Pangas 2010).

Estrogeni su 18C (18 ugljikovih atoma) steroidni hormoni u koje ubrajamo estron (E1), estradiol (E2) i estriol (E3). Najpotentniji među njima je estradiol koji se, kao što je već rečeno, stvara u jajnicima, dok se estron sintetizira uglavnom kao produkt periferne androstenoidne konverzije (također i u jetri pomoću 17β-hidroksisteroid konverzije estradiola), a estriol predstavlja glavni estrogen posteljice.

Koncentracija estradiola u serumu kontinuirano raste tijekom folikularne faze menstrualnog ciklusa, paralelno s rastom folikula (Slika 12.). U krvi je estradiol uglavnom nađen vezan uz

proteinske nosače, kao što su albumin (60%) i globulini, koji vežu spolne hormone (38%), dok se tek 2% estradiola nalazi u aktivnom, nevezanom, tj. slobodnom obliku sposobnom da infiltrira ciljne stanice (Mahutte i Ouhilal, 2007).



Slika 12. Fluktuacija koncentracije FSH, LH, estradiola, inhibina i progesterona tijekom trajanja menstruacijskog ciklusa (Preuzeto iz: Mahutte i Ouhilal, 2007)

Tijekom folikularne faze koncentracija estradiola uglavnom ne prelazi 50 pg/ml. No, u vrhuncu folikularnog rasta, koncentracija serumskog estradiola raste do 200-250 pg/ml te pada s ovulacijom, dok se slijedeći porast koncentracije dešava tijekom srednje lutealne faze, kao posljedica njegova lučenja iz žutog tijela, sve do njegove atrofije koja dovodi do naglog pada estrogena i progesterona te nastupa menstruacija (Preuzeto iz: Mahutte i Ouhilal, 2007). Estrogen predstavlja bitan intrafolikularni čimbenik koji stimulira proliferaciju granuloznih stanica i podupire staničnu aktivnost FSH i LH (Britt i Findlay, 2002). Po svemu sudeći, glavna uloga estrogena u ovulaciji predstavlja regulacija cikličkog oslobađanja gonadotropina preko ERα receptora (estrogen receptor alfa) u hipotalamusu te stimulacija folikulogeneze preko ERβ receptora (Drummond i Fuller, 2012; Kolibianakis i sur., 2005). Estrogen regulira serumsku koncentraciju gonadotropina tako da putem negativne povratne sprege inhibira

sekreciju GnRH. Estrogen osim toga djeluje i na proliferaciju višeslojnog pločastog epitela rodnice i proliferaciju endometrija te povećava motilitet i podražljivost jajovoda unutar kojeg dolazi do proliferacije trepetljikavog epitela. Pored toga, estrogen utječe na definiranje sekundarnih spolnih karakteristika kod žena koje nisu dostigle spolnu zrelost te potiče proliferaciju izvodnih kanalića dojke.

Zbog uske povezanosti između stvaranja estrogena i naprednih stadija folikulogeneze, estrogen se koristi kao marker folikularnog razvoja u prirodnom i stimuliranom menstrualnom ciklusu, a u procesu stimulacije jajnika, za IVF, estrogen se koristi za određivanje optimalnog vremena za poticanje sazrijevanja oocita (Kolibianakis i sur., 2005).

Progesteron je 21C steroidni hormon te predstavlja glavni hormon žutog tijela, odnosno sekretorne faze menstrualnog ciklusa (Slika 12.). Životni vijek žutog tijela i samim tim proizvodnja progesterona ovisi o kontinuiranom dotoku LH iz anteriornog režnja hipofize. Ako ne dođe do oplodnje (izostanak hCG), nastupa luteoliza, odnosno transformacija žutog tijela u *corpus albicans*, a ako do oplodnje dođe, hCG (humani korionski gonadotropin) trudnoće stimulira održavanje žutog tijela i stvaranja progesterona (25-50 mg na dan) i do 7 tjedana nakon fertilizacije. Nakon tog razdoblja, ulogu proizvodnje progesterona preuzima placenta (do 25mg na dan), a nakon porođaja i tijekom laktacije razina progesterona znatno pada (Ozlü i sur., 2012; Bates i Bowling, 2000). Tijekom folikularne faze njegova koncentracija iznosi obično < 2ng/ml, a svoj koncentracijski maksimum s vrijednostima > 5 ng/ml progesteron doseže tijekom srednje lutealne faze (Slika 12).

Glavnina progesterona u plazmi nalazi se vezana za albumin (80%), kortikosteroid vezujući globulin (18%) i u znatno manjem obimu za SHBG (0.5%), dok ostali dio dolazi u slobodnom, nevezanom obliku. Uklanjanje progesterona iz cirkulacije odvija se u jetri, gdje se on konvertira u pregnandiol i konjugiran s glukuronskom kiselinom izlučuje u urin (Beshay i Carr, 2013). Kao i u slućaju estrogena, aktivnost progesterona odvija se preko njegovih staničnih receptora PRA, PRB i PRC, s tim da je PRB pozitivni regulator funkcije progesterona dok PRA i PRC djeluju kao antagonisti PRB (Beshay i Carr, 2013; Wetendorf i DeMayo, 2014). Preko svojih receptora, progesteron djeluje na implantaciju, decidualizaciju i razvoj žlijezda endometrija (Wetendorf i DeMayo, 2012). U visokim koncentracijama progesteron, djelujući putem negativne povratne sprege na hipotalamus i hipofizu, inhibira lučenje FSH i LH, a u lutealnoj fazi smanjuje frekvenciju GnRH pulsa u hipotalamusu. On također dovodi do smanjenja estrogenskih receptor,a sprječavajući time hiperplaziju endometrija (Beshay i Carr, 2013). Osim toga, progesteron dovodi do konverzije estradiola u manje aktivni estron (Bates i Bowling, 2000).

Progesteron nije ključan samo za prijemčivost endometrija, već igra i ulogu u prevenciji kontrakcija miometrija i suzbijanju imunološkog odgovora majke na antigene ploda (Bates i Bowling, 2000). Budući da progesteron igra važnu ulogu u održanju trudnoće, koristi se kod pacijentica s opasnošću pobačaja i prijevremenog poroda (neuroendokrina deficijencija, defekt lutealne faze, hiperkontraktilnost miometrija, imunološka reakcija na antigene fetusa) te u medicinski potpomognutoj oplodnji za održavanje lutealne faze (Ozlu i sur., 2012; Di Renzo i sur., 2012).

Osim gonadotropina (FSH i LH,) hipofiza je odgovorna i za sekreciju TSH (hormon koji stimulira tiroideu), prolaktina, aktivina, folistatina i inhibina.

Poznato je da parakrina interakcija TSH i tiroidnih hormona (TH; TR3, TR4) u ženskom reproduktivnom traktu ima utjecaja na plodnost i fiziološko stanje jajnika, endometrija i placente (Colicchia i sur., 2014; Stavreus i Evers, 2012). Hormoni štitnjače u stalnoj su interakciji s ostalim hormonima koji sudjeluju u regulaciji menstrualnog ciklusa. TSH predstavlja snažan stimulans za sintezu prolaktina, odnosno nastanak hiperprolaktinemije, koja preko niza čimbenika dovodi do smanjenog pulsa GnRH sekrecije (odmak u LH odgovoru i neadekvatan razvoj žutog tijela) i interferira s ovulacijom (Longcope i sur., 1990; Scanlon i sur., 1981; Thomas i Reid, 1987). Kako su hormoni štitnjače bitni za maksimalnu proizvodnju estradiola i progesterona, nastanak hipotireoze može doprinijeti neplodnosti, čak i u izostanku hiperprolaktinemije. Zbog toga se u evaluaciji neplodnih žena (ovulacijski fčimbenik) rutinski izvodi određivanje koncentracije prolaktina i TSH (Cramer i sur., 2003). Reakcija jajnika na tireoidne hormone može se objasniti prisutnošću njihovih receptora u oocitama, a tireoidni hormoni također interreagiraju s FSH, stimuliranim LH/hCG receptorima te tako imaju direktan stimulacijski učinak na funkciju granuloznih stanica i proizvodnju progesterona (Wakim i sur., 1990; Cecconi i sur., 1999). Nadalje, pokazano je da je koncentracija serumskog TSH znatno veća u žena čije oocite ne bivaju oplođene, čime bi TSH mogao biti signifikantan prediktor uspjeha IVF procedure (Cramer i sur., 2003). Drugi važan parametar, putem kojeg hipotireoza može utjecati na neplodnost, predstavlja alteracija perifernog metabolizma estrogena i smanjenje proizvodnje SHBG globulina, rezultirajući na kraju modifikacijom mehanizma povratne sprege na nivou hipofize (Jones i sur., 2004; Krassas i sur., 2010).

Razina estrogena može biti i do 2-3 puta veća u žena s hipertireozom tijekom svih faza menstrualnog ciklusa, zahvaljujući smanjenom metaboličkom uklanjanju E2 i njegovim povećanim vezanjem za SHBG. Nadalje, neke studije pokazuju da su kod žena s

hipertireozom srednje vrijednosti LH tijekom folikularne i srednje lutealne faze signifikantno povećane (Krassas i sur., 2010).

Hipotireoza je povezana s povećanom učestalošću spontanih pobačaja, preuranjenog porođaja i/ili smanjene težine ploda, fetalnog distresa za vrijeme poroda te trudnoćom uzrokovane hipertenzije i abrupcije placente (Krassas i sur., 2010).

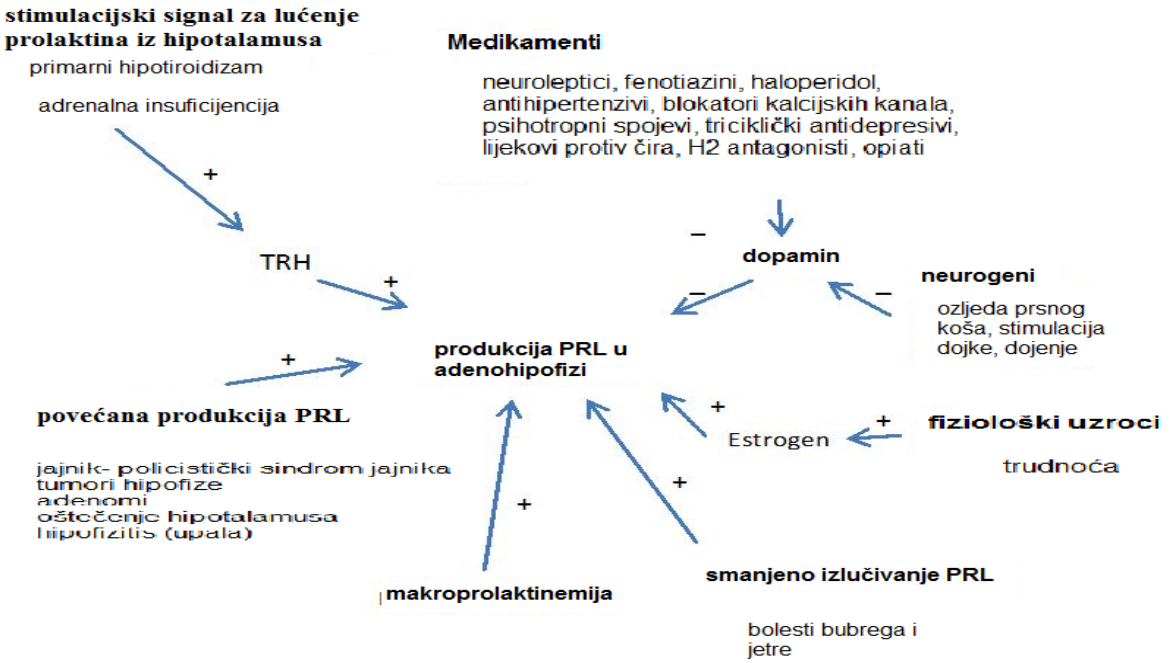
Najučestaliji uzrok hipotireoze u žena reprodukcijske dobi predstavlja autoimuna bolest štitnjače (20-50% trudnih žena). Izolirana autoimuna bolest štitnjače povezana je s povišenim rizikom spontanog pobačaja u prvom tromjesečju trudnoće, a žene s hipotiroidizmom češće imaju neurednosti menstruacijskog ciklusa, neplodnost ili imaju povišen rizik za morbiditet u trudnoći (Poppe i sur., 2007; Krassas i sur., 2010).

Kontrolirana stimulacija jajnika koja se provodi tijekom potpomognute medicinske oplodnje, dovodi često do značajnog povećanja razine estradiola, što može imati bitan utjecaj na koncentraciju tiroidnih hormona i TSH, a njen utjecaj može postati drastičniji u slučaju prisutnosti autoimune bolesti štitnjače (Krassas i sur., 2010).

Tijekom tog postupka, ovisno o trajanju stimulacije, očekivano je povišenje TSH, a njegovo povišenje izrazitije je ukoliko pacijentica ima prisutna antitireoidna protutijela. Promjene koncentracije hormona štitnjače tijekom stimulacije nemaju utjecaj na konačni ishod pomognute medicinske oplodnje, osim u slučaju razvoja sindroma hiperstimulacije kod pacijentica s prisutnim antitireoidnim protutijelima. U ovom slučaju zbivaju se dramatične promjene koje dovode do izraženog hipotiroidizma s izravnim utjecajem na ishod postupka potpomognute medicinske oplodnje (Poppe i sur., 2008; Krassas i sur., 2010).

Prolaktin je multifunkcionalni polipeptidni hormon (198 aminokiselina) laktotropnih stanica adenohipofize, neophodan za normalnu reprodukciju (Bernichtein i sur., 2010). Iako je glavnina serumskog prolaktina porijeklom iz adenohipofize, prolaktin se luči i u nekim drugim stanicama i tkivima u tijelu (poput mozga, decidue, miometrija, lakrimalnih žlijezda, dojki, timusa, slezene, limfocita), no u njima ima prvenstveno lokalnu funkciju, putem autokrine/parakrine signalizacije. Prvotno je otkriven kao hormon koji stimulira razvoj mliječnih žlijezda i laktaciju no do danas mu je pripisano više od 300 različitih uloga, od kojih velik broj utječe na reproduktivne sposobnosti (Bachelot i Binart, 2007). Njegova aktivnost odvija se preko dva tipa receptora, odnosno duge i kratke izoforme koje su obje izražene u jajniku (granulozne i teka stanice, stanice žutog tijela i maternice (endometrij, placenta) (Devi i Halperin, 2014). Kao što je već rečeno, povećana koncentracija prolaktina (Slika 13.), odnosno hiperprolaktinemija (>20ng/ml) dovodi do inhibicije oslobađanja GnRH te

posljedično tomu inhibicije LH i FSH ovisnih funkcija jajnika. Povećane koncentracije prolaktina povezane su s anovulacijom i mogu dovesti do direktne ili indirektne neplodnosti.



Slika 13. Regulacija proizvodnje prolaktina
Slika ilustrira mehanizme negativne i pozitivne povratne sprege koji djeluju na stvaranja prolaktina u adenohipofizi. Neurotransmiter dopamin odgovoran je za glavni, negativni signal koji koči lućenje prolaktina dok signal koji potiče lućenje prolaktina dolazi iz hipotalamusa u vidu TRH. Balans ta dva signala uvjetuje količinu oslobođenog prolaktina u adenohipofizi. **PRL-** prolaktin **(**Preuzeto iz: Gokalp, 2013).

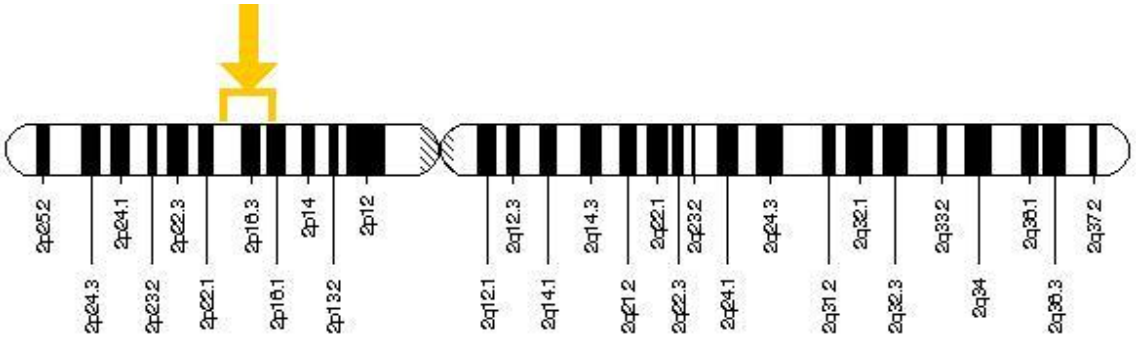
Inhibin je polipeptid kojeg uglavnom luče granulozne i teka stanice, ali je također nađen i među gonadotropinima hipofize. Građen je od alfa i beta podjedinice i dolazi u dva oblika, kao inhibin A i inhibin B. Oba inhibina dijele istu alfa podjedinicu i jedinstvenu beta podjedinicu. Inhibin A se uglavnom luči u lutealnoj, a inhibin B u folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa. Oslobađaju se pod utjecajem FSH i selektivno inhibiraju njegovu sekreciju u adenohipofizi putem mehanizma negativne povratne sprege.

Nasuprot inhibinu **aktivin**, kojeg također luče granulozne stanice jajnika, potiče sintezu FSH, stimulirajući sintezu GnRH receptora. Djelovanje aktivina blokiraju inhibin i folistatin.

Folistatin je još jedan od gonadotropina hipofize koji inhibira sintezu FSH, tako da uklanja aktivin. Aktivin stimulira, a inhibin koči proizvodnju folistatina.

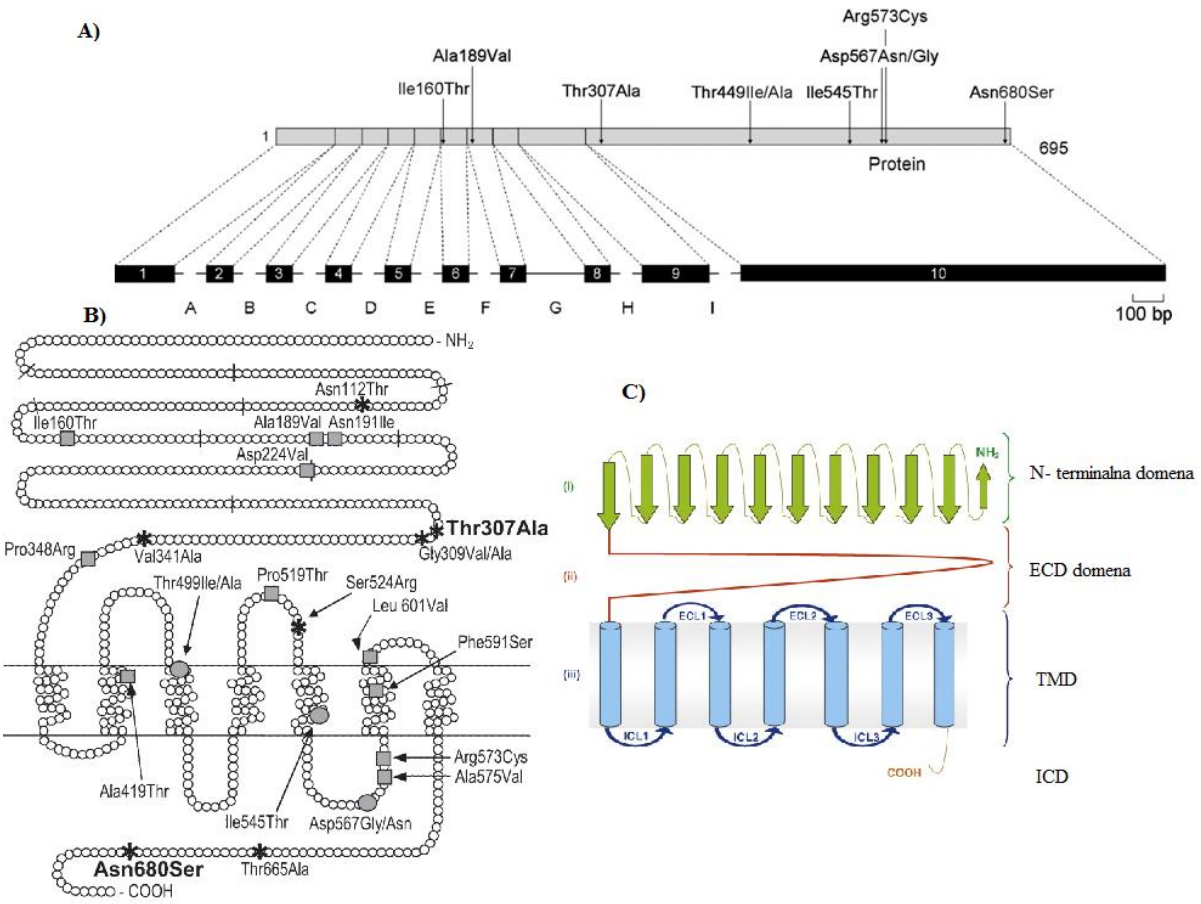
2.1.4. FSHR – Receptor za folikulo-stimulirajući hormon

FSH djeluje na ciljne stanice aktiviranjem svog specifičnog receptora, koji je ključan za folikulogenezu i proizvodnju estrogena (Slika 14). FSHR, gen ID: 2492, location: 2p21–p16, OMIM: 136435) (Richards i Midgley, 1976; Simoni i sur., 1997).



Slika 14. Kromosomski položaj *FSHR* gena
FSHR gen smješten je na kratkom kraku (p) ljudskog kromosoma 2, na položaju 2p21–p16 odnosno od 48,962,156 do 49,154,526 baznog para (Preuzeto iz: http://ghr.nlm.nih.gov/gene/*FSHR*).

Zajedno s drugim glikoproteinskim hormonskim receptorima (LH/CGR i TSHR), FSHR spada u podgrupu GPCR (*eng. G-protein-coupled receptors*) receptora.
Gen za FSHR protein dug je 192 kb (kilo baze) i sastoji se od 10 egzona i 9 introna (Gromoll i sur., 1994). Prvih 9 egzona *FSHR* gena kodira N-terminalnu domenu proteina dok egzon 10 kodira C-terminalni dio izvanstanične domene (*eng. extracellular domain*, ECD*; hinge region*), transmembransku domenu (*eng. transmembrane domain, TMD*) i unutarstaničnu domenu receptora. TMD domena FSHR proteina sastoji se od 7 α uzvojnica povezanih sa tri unutarstanične (*eng. extracellular loops, ELs*) i tri izvanstanične (*eng. intracellular loops*, ILs) petlje dok je ICD (*eng. intracitoplasmatic domain*) područje, uglavnom vezano za G proteine, odgovorno za inicijaciju signalne kaskade koje rezultiraju specifičnim biološkim učinkom liganda odnosno FSH hormona (Slika 15) (Fan i Hendrickson, 2005; Jiang i sur., 2012).



Slika 15. Građa FSHR proteina

Gornji (A) i donji lijevi (B) dio slike prikazuje neke od mutacija otkrivenih u *FSHR* genu odnosno njihov aminokiselinski izričaj u FSHR proteinu. Na donjem lijevom (B) i desnom (C) dijelu slike prikazana je također i shematska organizacija proteinskih domenama FSHR receptora. **Ala-** alanin; **Arg-** arginin; **Asn-** asparagin; **Asp-** asparaginska kiselina; **Cys-** cistein; **Ile-** ileucin; **Leu-** leucin; **Phe-** fenilalanin; **Pro-** prolin; **Ser-** serin; **Thr-** threonin; **Val-** valin **(**Preuzeto iz: (A) Mueller i sur., 2010; (B) Laan i sur., 2012; (C) Binder i sur., 2008).

U zadnjem desetljeću otkriven je cijeli niz aktivirajućih (Tablica 4.) i inaktivirajućih (Tablica 5.), točkastih mutacija (*engl. single nucleotide polymorphisms, SNP*), te varijanti posttranskripcijskog prekrajanja (*engl. splicing*) *FSHR* gena u pojedinim slučajevima neplodnosti, kod žena i muškaraca.

Genotip–fenotip asocijacijske studije i funkcionalna karakterizacija ovih mutacija *in vitro* rezultirale su vrijednim informacijama o njihovom utjecaju na interakciju sa FSH i daljnji prijenos signala u ciljnim stanicama (Desai i sur., 2013).

Što se tiče SNP mutacija (Slika 16) *FSHR* gena do sada je zabilježeno >1300 SNPs u nekodirajućem te 8 SNP mutacija u kodirajućem području gena (Desai i sur., 2013). Najčešće proučavani SNP polimorfizmi *FSHR* gena prikazani su u tablici 6.

Tablica 4. Aktivirajuće mutacije *FSHR* gena u žena i muškaraca koje potiču aktivnost FSHR

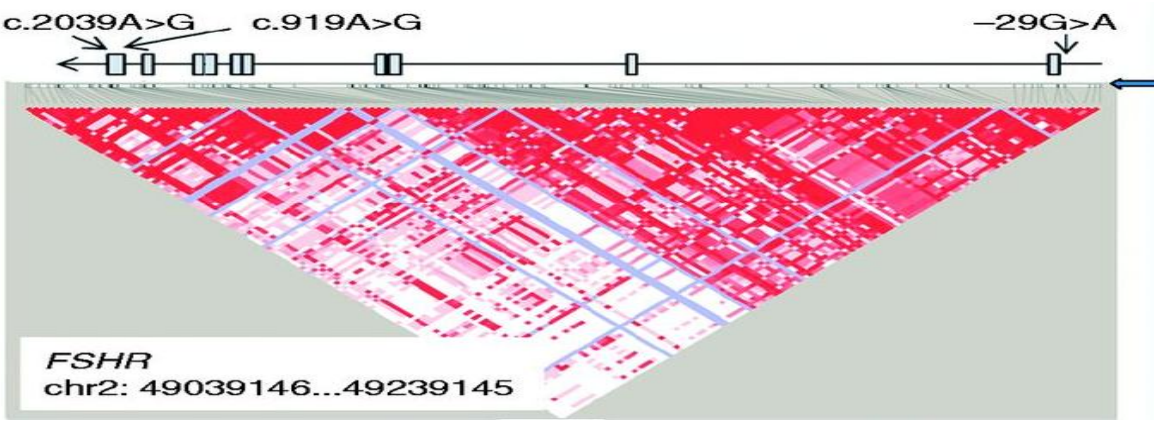
***In vitro* funkcionalna analiza**							
					koncentracija cAMP		
promjena nukleotida (egzon)	promjena aminokiseline (regija)	fenotip	ekspresia FSHR	vezanje FSH	Bazalna (konstitutivna aktivnost)	FSH-induciran cAMP	Reference
1700A>G (egzon 10)	$Asp^{567}Gly$ (IL3)	muškarac s hipofizektomijom sa nedetektabilnom razinom serumskog FSH	ND	ND	1.5-puta veća	slična nakon stimulacije sa FSH	Gromoll i sur.. (1996)
heterozigotna mutacija							
1699G>A (egzon 10)	$Asp^{567}Asn$ (IL3)	žena sa sOHSS	smanjena ekspres	slično	tri puta veća	slična nakon stimulacije sa FSH povećana u odgovoru na hCG and TSH	Smits i sur.. (2003)
heterozigotna mutacija							
1292A>T (egzon 10)	$Asn^{431}Ile$ (EL1)	normalna spermatogeneza, suprimiran serumski FSH	reducirana ekspresija na površini stanica	smanjeno	manja	veća nakon FSH stimulacije kad dolazi do normalizacije ekspresije receptora	Casas-González i sur. (2012)
heterozigotna mutacija							
1346C>T (egzon 10)	$Thr^{449}Ile$ (TMD heliks 3)	žena sa sOHSS	slična	slično	slična	slična nakon stimulacije sa FSH, povećana na hCG bez efekta sa TSH	Vasseur i sur. (2003)
heterozigotna mutacija							
1345A>G (egzon 10)	$Thr^{449}Ala$ (TMD heliks 3)	žena sa sOHSS	dva puta povećana ekspresija receptora	ND	2.5-puta veća	slična nakon stimulacije sa FSH povećana u odgovoru na hCG and TSH	Montanelli i sur.. (2004)
heterozigotna mutacija							
1634T>C (egzon 10)	$Ile^{545}Thr$ (TMD heliks 5)	žena sa sOHSS	77% ekspresije na površini stanice	slično	130% povećana	povećana nakon stimulacije sa FSH, hCG, i TSH	De-Leener i sur. . (2006)
heterozigotna mutacija							
383C>A (egzon 5) heterozigotna mutacija	$Ser^{128}Tyr$ (ECD)	žena sa sOHSS	36% ekspresije na površini stanice	ND			De-Leener i sur. . (2006)

Legenda: ECD- izvanstanična domena (*eng. extracellular domain*); **EL**- izvanstanične petlje (*eng. extracellular loops*); **IL**- unutarstanične petlje (*eng. intracellular loops*); **ND**- nije određeno (*eng. not determined*); **sOHSS**- spontani ovarijski hiperstimulacijski sindrom (*eng. spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome*); **TMD**- *eng.ransmembrane domain;* **cAMP**- ciklički adenozinmonofosfat; **FSH**- folikul-stimulirajući hormonm; **FSHR**- FSH receptor; **hCG**- humani korionski gonadotropin; **TSH**- tiroidni stimulirajući hormon; **Ala**-alanin; **Asp**-asparaginska kiselina; **Asp**- asparagin; **Gly**- glicin; **Ile**- ileucin; **Ser**- serin; **Thr**-treonin; **A**- adeniin; **C**- citozin; **G**- gvanin, **T**- timin (Preuzeto iz: Desai i sur., 2013).

Tablica 5. Inaktivirajuće mutacije *FSHR* gena u žena i muškaraca koje koče aktivnost FSHR

			učinak mutacije (*in vitro* analiza)			
promjena nukleotida (broj egzona)	**promjena aminokiseline** (regija)	**Fenotip**	ekspresija FSHR	vezanje FSH	FSH-induciran cAMP	**Reference**
566C>T (egzon 7)	Ala^{189}Val (ECD)	hipergonadotropna disgeneza jajnika	pogođena	smanjeno	smanjeno	Aittomäki isur. (1995)
homozigotna mutacija		varijabilni poremećaja spermatogeneze				Tapanainen .i sur. (1997)
573A>T (egzon 7)	Asn^{191}Ile (ECD)	fertilne žene s normalnom funkcijom jajnika	ND	ND	nema	Gromoll i sur. (1996)
heterozigotna mutacija						Gromoll i sur. (2002)
662T>G (egzon 8)	Val^{221}Gly (ECD)	primarna amenorrhea	ND	ND	ND	Nakamura i sur. (2008)
heterozigotna mutacija						
1043C>G (egzon 10)	Pro^{348}Arg (ECD hinge region)	Primarna amenorrhea s povećanom razinom serumskog FSH	ND	nema	nema	Allen i sur. (2003)
hemizigotna mutacija sa naslijeđenom /*de novo* mikrodelecijom ili *de novo* konverzijom gena						
479C>T (exon 6)	Ile^{160}Thr (ECD)	Sekundarna amenorrhea s povećanom razinom serumskog FSH	pogođena	smanjeno	smanjeno	Beau i sur. (1998)
1717C>T (egzon 10)	Arg^{573}Cys (IL3)		ND	slično	smanjeno	
složeni heterozigotni prenosilac obiju mutacija						
671A>T (egzon 7)	Asp^{224}Val (ECD)	Primarna amenorrhea s povećanom razinom serumskog FSH	pogođena	smanjeno	nema	Touraine i sur. (1999)
1801C>G (egzon 10)	Leu^{601}Val (EL3)		ND	slično	smanjeno	
Compound heterozygous carrier of both mutations						
566C>T (egzon 7)	Ala^{189}Val (ECD)	Primarna amenorrhea s povećanom razinom serumskog FSH	pogođeno	smanjeno	nema	Doherty i sur. (2002)
1255G>A (egzon 10)	Ala^{419}Thr (TMD heliks 2)		ND	slično	nema	
složeni heterozigotni prenosilac obiju mutacija						
1555C>A (egzon 10)	Pro^{519}Thr (EL2)	Primarna disfunkcija jajnika s FSH razinom	pogođeno	minimalna	nema	Meduri i sur. (2003)
homozigotna mutacija						
1231A>T (egzon 10)	Ile^{411}Asn (TMD heliks 2)	PCOS	ND	ND	slično	Orio . (2006)
heterozigotna mutacija						
1760C>A (egzon 10)	Pro^{587}His (TMD heliks 6)	Primarna amenorrhea	ND	ND	nema	Kuechler i sur. (2010)
mutacija jednog alela s nebalansiranom translokacijom						
1723C>T (egzon 10)	Ala^{575}Val (TMD heliks 6)	Primarna amenorrhea with s hipergonadotropnim hipogonadizmom	ND	ND	ND	Achrekar i sur. (2010)
homozigotna mutacija						

Legenda: ECD- izvanstanična domena (*eng. extracellular domain*); **EL**- izvanstanične petlje (*eng. extracellular loops*); **IL**- unutarstanične petlje (*eng. intracellular loops*); **ND**- nije određeno (*eng. not determined*); **TMD**- *eng.ransmembrane domain;* **cAMP**- ciklički adenozinmonofosfat; **FSH**- folikul-stimulirajući hormonm; **FSHR**- FSH receptor; **PCOS**- policistički ovarijski sindrom; **Ala**- alanin; **Arg**- arginin; **Asn**- asparagin; **Asp**-asparaginska kiselina; **Cys**- cistein; **Gly**- glicin; **His**- histidin; **Ile**- ileucin; **Pro**- prolin; **Ser**- serin; **Thr**- treonin; **Val**- valin; **A**- adenin; **C**- citozin; **G**- gvanin; **T**- timin (Preuzeto iz: Desai i sur., 2013).



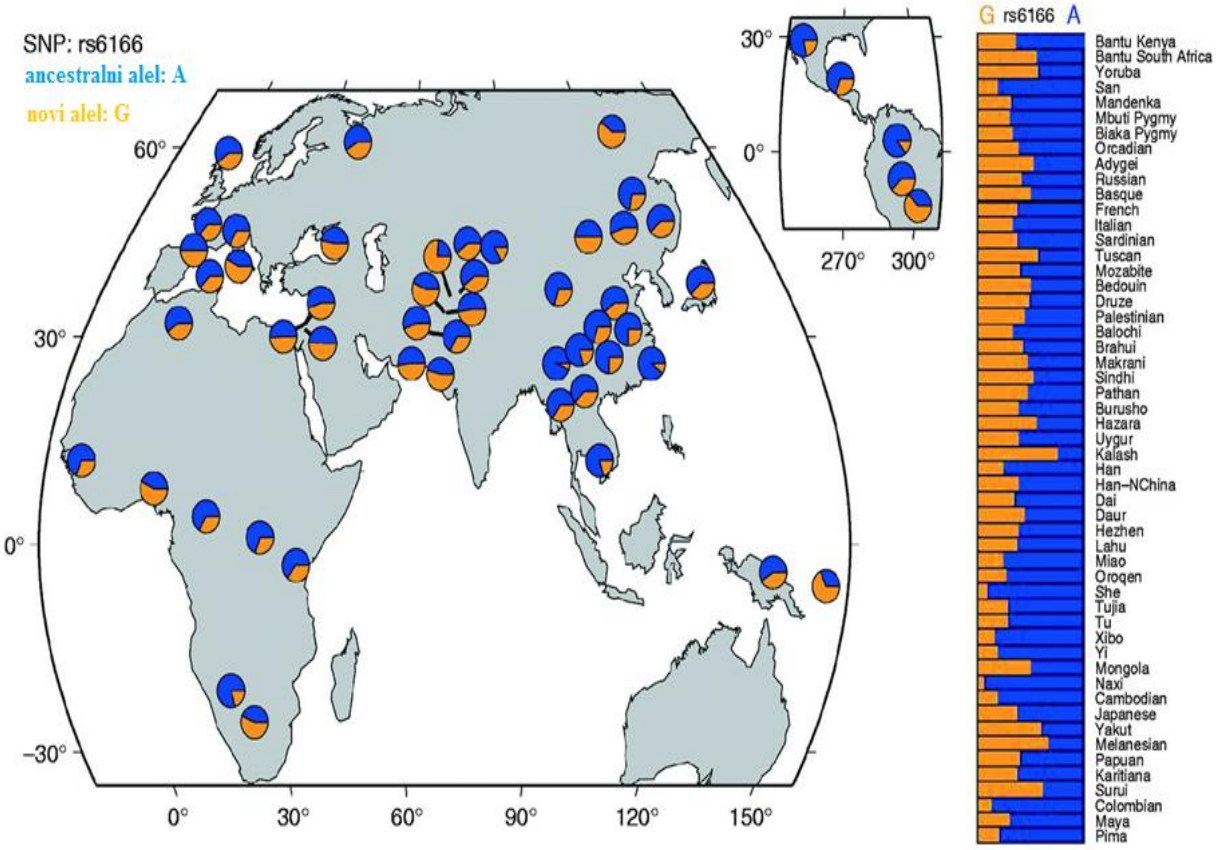
Slika 16. Shematski prikaz SNP mutacija unutar ljudskog *FSHR* gena
Prikazano je 200 kilobaza dugo genomsko područje kromosoma 2 s humanim FSHR genom. Egzoni su prikazani bijelim kvadratima s indiciranom pozicijom *SNP rs6166* (*c.2039A>G*), *rs6165* (*c.919A>G*) i *rs1394205* (*−29G>A*); **A-** adenun; **G-** gvanin; **chr2-** kromosom 2 (Preuzeto iz: Simoni i Casarini, 2014).

Tablica 6. Najčešće istraživani *SNP* polimorfizmi *FSHR* gena kod ljudi

Gen	ref. *SNP*	DNA nukleotid	SNP varijacija	NCBI referentna sekvenca nukleotida	Protein	NCBI referentna sekvenca proteina
FSHR	rs1394205	−29G>A	49381585C>T	NT_022184.15	UTR 5	P23945.3
FSHR	rs6165	919G>A	49191041C>T	NT_022184.15	A307T	P23945.3
FSHR	rs6166	2039A>G	49189921T>C	NT_022184.15	N680S	P23945.3

Legenda: **UTR5-** *eng. five prime untranslated region*; **G-** gvanin; **A-** alanina; **T-** timin; ***SNP-*** *eng. single nucleotide polimorphism* (Prema: Desai i sur., 2013)

Što se tiče *SNP* polimorfizama u kodirajućem području *FSHR* gena, šest ih je nesimptomatskih, a druga dva, odnosno *SNP* polimorfizam na poziciji Thr^{307}Ala (rs6165) i SNP na poziciji *Asn^{680}Ser (rs6166)*, spadaju u najistraživanije polimorfizme *FSHR* gena. *SNP Thr^{307}Ala (rs6165)* smješten je u zglobnom području ECD domene proteina dok se *SNP Asn^{680}Ser (rs6166)* nalazi u ICD području receptora (Desai i sur., 2013). *SNP* polimorfizmi *rs6165* i *rs6166* nalaze se unutar istog egzona 10 te dolaze u jakoj vezanoj neravnoteži. Stoga se najčešće proučava učestalost *Asn^{680}Ser (rs6166)* polimorfizma. Najčešće su zastupljeni u *Thr^{307}- Asn^{680} i Ala^{307}- Ser^{680}* varijantama koje su kod bijelaca zastupljene u podjednakoj frekvenciji (Desai i sur., 2013). Do danas nije otkrivena funkcionalna uloga ovih dvaju polimorfizama, no budući da *Asn^{680}* predstavlja konsenzus mjesto za glikozilaciju, a *Ser^{307}* za fosforilaciju, pretpostavlja se da ove dvije izoforme mogu doprinijeti unutarstaničnom transportu i obrtaju FSHR proteina (Davis i sur., 1995; Desai i sur., 2013). Zemljopisna distribucija *FSHR* alela *rs6166 (c.2039A>G)* prikazana je na slici 17.



Slika 17. Shematski prikaz zemljopisne distribucije *FSHR* alela rs6166 (*FSHR* c.2039A>G)

Mapa sa zemljopisnim kordinatama prikazuje distribuciju alela A i G a lijevo je prikazana njihova učestalost za pojedine populacije. ***SNP-*** *eng. single nucleotide polymorphism*; **A-** adenin; **G-** gvanin **(** Preuzeto iz: Simoni i Casarini, 2014).

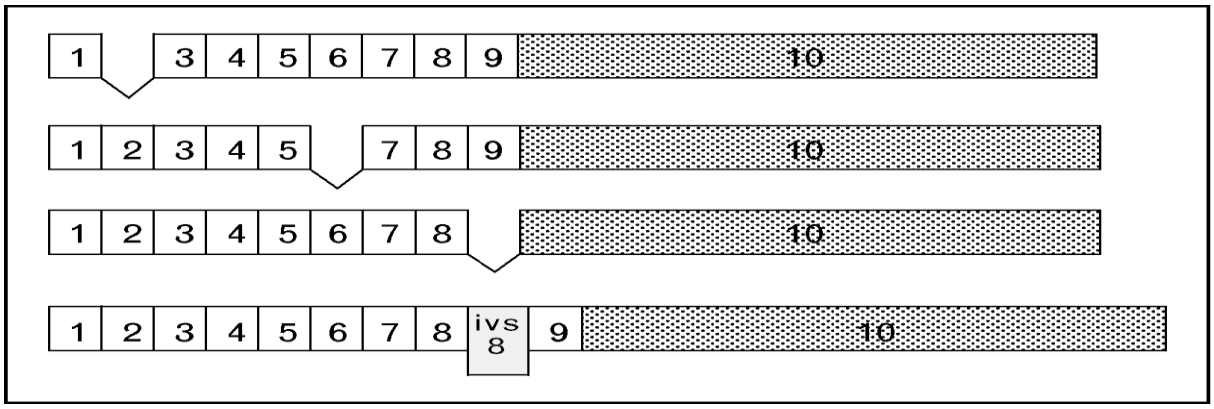
Osim prethodno navedenih, među često istraživane SNP polimorfizme spadaju i dva SNP polimorfizma u 5′ UTR (*eng. untranslated region*) području *FSHR* gena na poziciji−29 (rs1394205) i −114 (Wunsch i sur., 2005). Do danas ispitani utjecaji navedenih polimorfizama na hormonske parametre i odgovor na kontroliranu stimulaciju jajnika u metodama potpomognute medicinske oplodnje prikazani su u tablici 7.

Alternativne varijante prekrajanja *FSHR* gena (Slika 18) kod čovjeka nađene su unutar egzona 9 u normalnom tkivu testisa, a alternativne varijante prekrajanja *FSHR* gena unutar egzona 9, delecije egzona 6 i 9 i djelomična insercija introna 8 nađene su u tkivu testisa infertilnih muškaraca. Kod infertilnih žena u postupku *IVF* nađene su delecije egzona 2, 6 i 9 i insercija 102 bp introna 8, a klinički parametri tih žena sugeriraju povezanost delecije egzona 2 sa slabim a delecije egzona 6 sa pojačanim odgovorom jajnika na kontroliranu stimulaciju (Gerasimova i sur., 2010).

Tablica 7. Rezultati objavljenih studija o utjecaju polimorfizama *FSHR* gena na kontroliranu stimulaciju jajnika tijekom IVF protokola

SNP	ispitanici (*n*)	rezultat studije	Reference
Asn^{680}Ser	161	Žene sa Ser/Ser i Asn/Ser genotipom pokazuju signifikantno veće bazalne razine FSH i zahtijevaju signifikantno veće doze FSH za kontroliranu stimulaciju jajnika u usporedbi sa Asn/Asn genotipom	Perez-Mayorga (2000)
		E2 razina na hCG dan, broj folikula i oocita slični kod žena sa sva tri genotipa	
	58	Žene sa Ser/Ser genotipom signifikantno povezane sa povećanom razinom egzogenog FSH i smanjenom razinom E2 na dan hCG administracije	Sudo (2002)
		Broj dobivenih oocita sličan kod sva tri genotipa	
	102	Ser/Ser genotip pokazuje signifikantno veću razinu bazalnog FSH i veći IVF ciklusa	de-Castro (2004)
		E2 razina na hCG dan, broj folikula i oocita slični kod žena sa sva tri genotipa	
	93	Žene sa Ser/Ser genotipom zahtijevaju veću ukupnu dozu FSH (225 U/dan) za kontroliranu stimulaciju jajnika u usporedbi sa Asn/Asn genotipom (koje dobivaju 150 U/dan) da bi došlo do sličnog odgovora jajnika	Behre (2005)
		Bazalni FSH, broj folikula, oocita i stopa trudnoće ne razlikuje se između Ser/Ser (150 U/dan), Ser/Ser (250 U/dan), i Asn/Asn (150 U/dan) grupa	
	148	Žene sa Ser/Ser genotipom imaju signifikantni veće bazalne razine FSH levels, alisu razine E2 na hCG dan, egzogenog FSH, broj folikula i oocita slične u usporedbi sa Asn/Asn i Asn/Ser genotipom	Laven .(2003)
	105	Žene sa Ser/Ser genotipom signifikantno veću stopu implantacije i trudnoće od onih sa Asn/Asn genotipom	Klinkert (2006)
	421	Ukupna količina egzogenog FSH i broj prikupljenih oocita sličan kod sva tri genotipa	Mohiyiddeen . (2012)
	64	Žene sa Ser/Ser genotipom povezane sa većim pragom jajnika na FSH, smanjenom negativnom povratnom spregom lutealne sekrecije i dužim menstrualnim ali pokazuju signifikantno veći broj antralnih folikula	Greb (2005)
		E2 na hCG dan, inhibin B i brzina rasta dominantnog folikula nisu signifikantno različiti između tri genotipa	
	79	Žene sa Asn/Ser genotipom stvaraju signifikantno veću količinu estradiola i veći broj folikula i oocita u usporedbi sa ženama Ser/Ser i Asn/Asn genotipa	Loutradis (2006)
	37	Ser^{680} alel predstavlja veći rizik za iatrogeni OHSS u usporedbi sa Asn^{680} alelom, ali je Asn^{680} alel signifikantno povezan sa ozbiljnošću iatrogenog OHSS	Daelemans (2004)
	427	Žene sa Ser/Ser genotipom imaju veću mogućnost hiper odgovora na kontroliranu stimulaciju od žena sa Asn/Asn genotipom	Boudjenah (2012)
Thr^{307}Ala	50	Žene sa Ala^{307}Ala genotipom su signifikantno povezane sa manjom dozom egzogenog FSH, većom razinom E2 prije i na dan hCG stimulacije	Achrekar (2009)
		85% žena sa Ala/Ala genotipom razvilo OHSS	
G>A −29	202	Razina bazalnog FSH i E2 nisu signifikantno različite između tri genotipa na poziciji −29	Wunsch (2005)
	50	Žene sa AA genotipom imaju manju razinu E2, manji broj folikula i oocita i veću ukupnu količinu egzogenog FSH u usporedbi sa GG genotipom	Achrekar (2009)
	100	Razina ekspresije FSHR na nivou mRNA i proteina bila je signifikantno smanjena kod žena sa AA genotipom u usporedbi sa ženama GG genotipa	Desai .(2011)

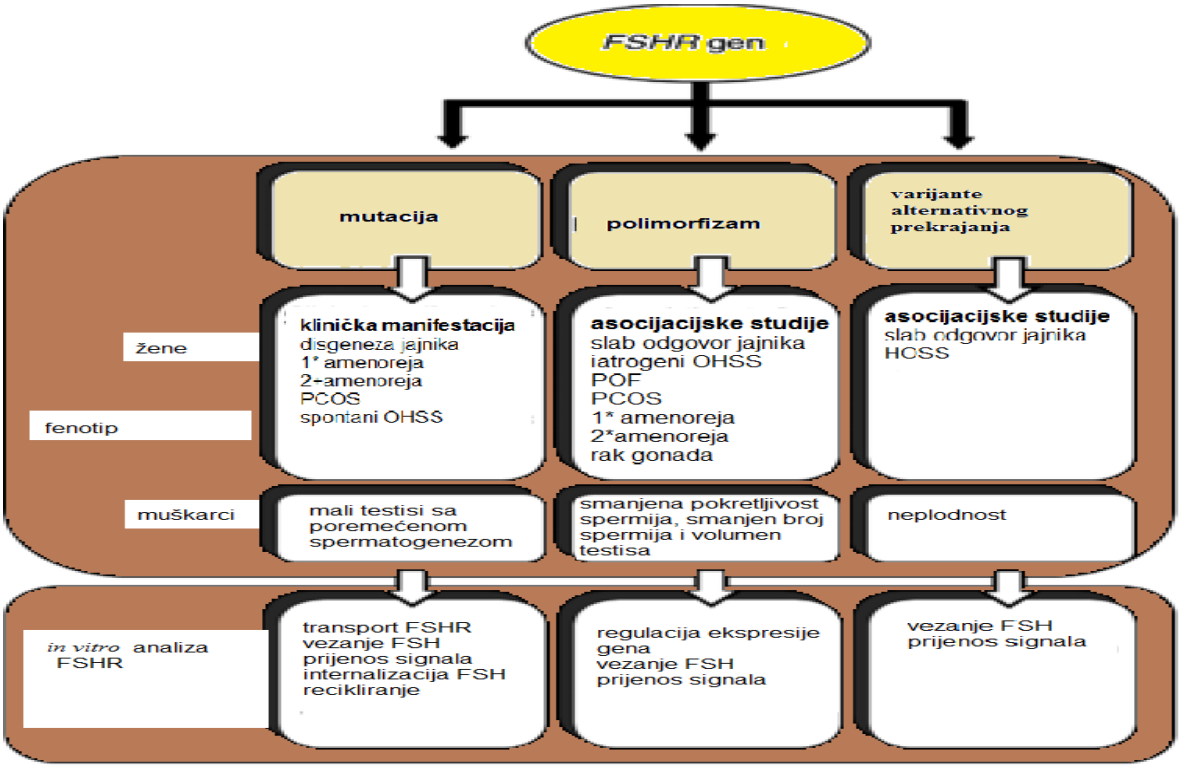
Legenda: FSH- folikul-stimulirajući hormonm; **FSHR**- FSH receptor; **hCG**- humani korionski gonadotropin; **Asn**- asparagin; **Ser**- serin; humani korionski gonadotropin; **E2**- estradiol; OHSS- ovarijski hiperstimulacijski sindrom; **IVF**- *in vitro* fertilizacija (Preuzeto iz: Desai i sur., 2013).



Slika 18. Shematski prikaz poznatih varijanti alternativnog prekrajajnja *FSHR* gena detektiranih kod pacijentica podvrgnutih in vitro oplodnji

Kod infertilnih žena u postupku IVF nađene su delecije egzona 2, 6 i 9 i insercija 102 bp introna 8, a klinički parametri tih žena sugeriraju povezanost delecije egzona 2 sa slabim, a delecije egzona 6 sa pojačanim odgovorom jajnika na kontroliranu stimulaciju. Sve prikazane varijante alternativnog izrezivanja pogađaju izvanstaničnu dio FSHR proteina. **ivs-** (eng. intervening sequence) intron (Preuzeto iz: Lalioti, 2011; reproducirano prema: Gerasimova i sur., 2010).

Pregled poznatih mutacija *FSHR* gena i povezanih fenotipova prikazan je na slici 19.



Slika 19. Shematski prikaz mutacija *FSHR* gena i s njima povezanih fenotipova

FSH- folikul-stimulirajući hormon; **FSHR-** FSH receptor; **OHSS-** ovarijski hiperstimulacijski sindrom; **POF-** *eng. premature ovarian failure*; **PCOS-** policistički ovarijski sindrom; (Preuzeto iz: Desai i sur., 2013).

2.1.5. Liječenje neplodnosti

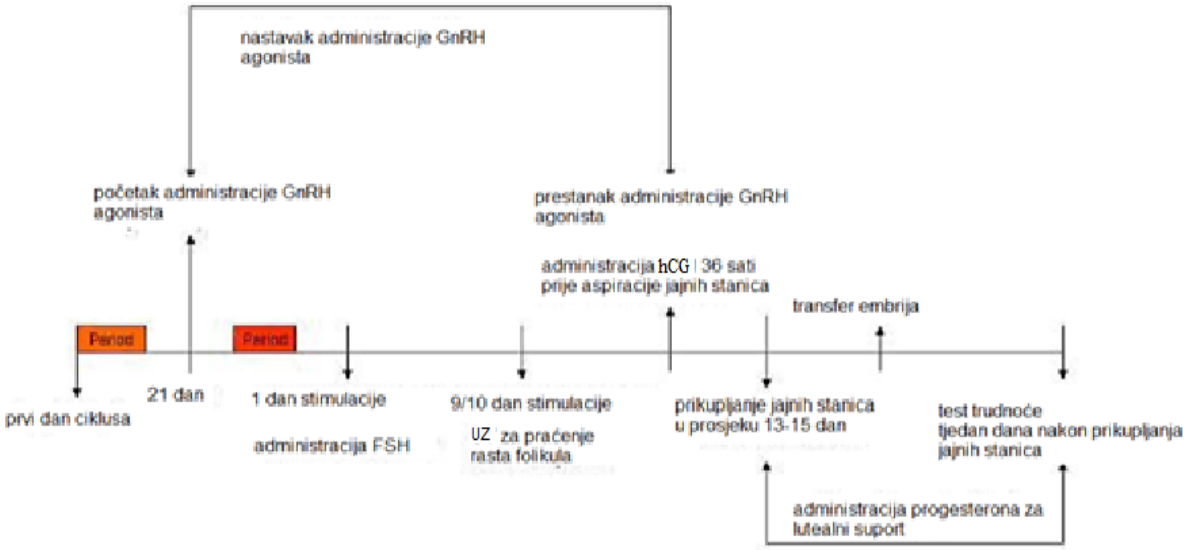
Obrada neplodnih parova započinje detaljnom anamnezom i liječničkim pregledom ispitanika. Kod ženskog partnera vrši se ginekološki pregled sa Papa testom, bakteriološkim brisevima cerviksa, transvaginalnim ultrazvukom te hormonskom obradom, odnosno određivanjem bazalnih koncentracija FSH, LH, E2 prolaktina, progesterona i TSH (3. dan menstruacijskog ciklusa). Kod muškog partnera vrši se analiza spermatograma, koji će dati podatke o broju, morfologiji i pokretljivosti spermija a ako se u ejakulatu nađu bijele krvne stanice treba izvršiti i bakteriološku analizu ejakulata i urina. Odabir postupka medicinski potpomognute oplodnje ovisi prvenstveno o duljini trajanja neplodnosti, uzroku neplodnosti i dobi žene te željama pacijenata.

Metode medicinski potpomognute oplodnje, koje se danas najčešće koriste u praksi, uključuju:

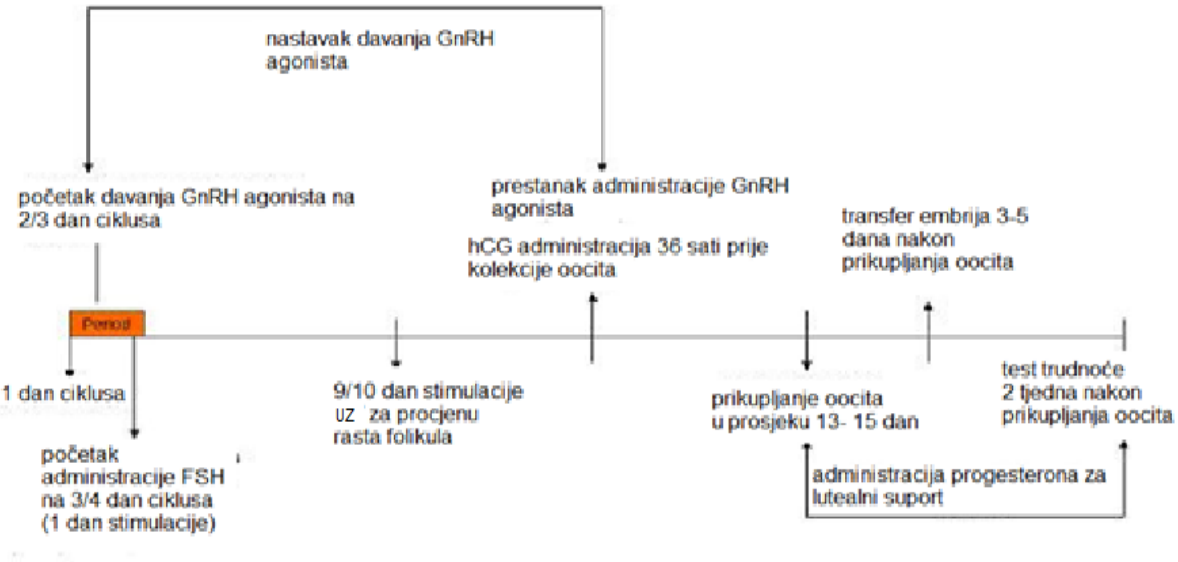
1. kontroliranu stimulaciju jajnika za dobivanje što većeg broja folikula, odnosno jajnih stanica, čime se povećava mogućnost ostvarivanja trudnoće
2. redovitu folikulometriju transvaginalnim ultrazvučnim pregledom jajnika i endometrija za tempiranje postupka, kako same inseminacije (metoda intrauterine inseminacije), tako i postupka punkcije i aspiracije folikula za postupak *in vitro* fertilizacije
3. aspiraciju jajnih stanica
4. prijenos zametka u maternicu (engl., embryo transfer)
5. inseminaciju (intrauterina inseminacija- tretman neplodnih ili subfertilnih parova kod kojih uzrok neplodnosti leži u muškom partneru) ili fertilizaciju putem ICSI (intracitoplazmatske injekcije spermija)
6. *in vitro* kulturu embrija

Kontrolirana stimulacija jajnika vršiti se korištenjem: klomifen citrata; GnRH analoga; GnRH agonista- putem tzv. dugog i kratkog protokola GnRH antagonista; egzogenih gonadotropina; lijekova za supresiju LH; lijekova za podršku žutom tijelu.

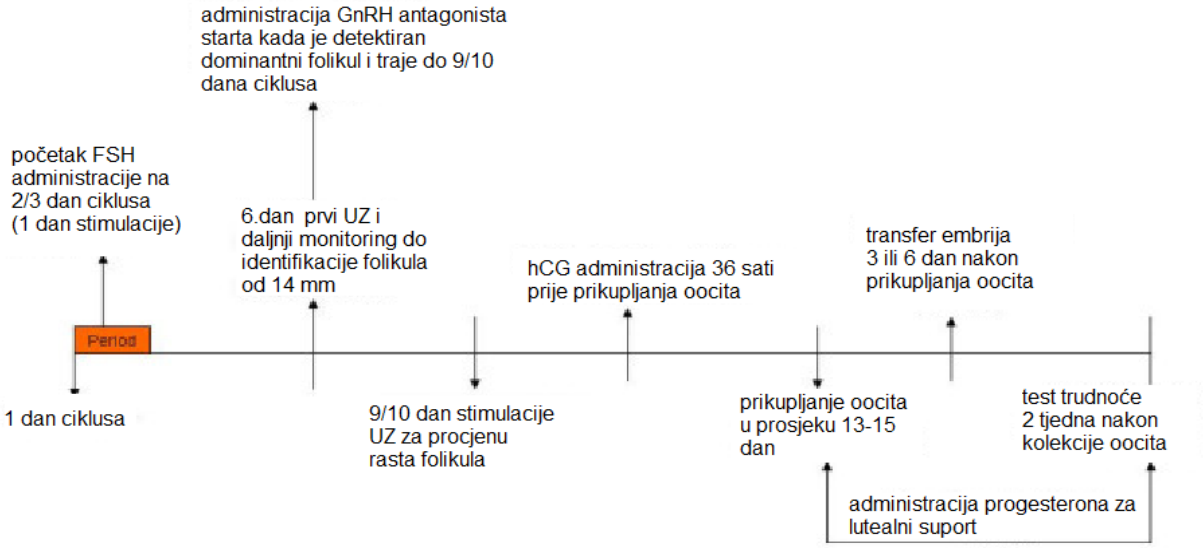
Shematski prikaz dugog (Slika 20) i kratkog protokola (Slika 21) GnRH agonista te GnRH antagonista za kontroliranu stimulaciju jajnika (Slika 22).



Slika 20. Shematski prikaz kontrolirane stimulacije jajnika tzv. dugim protokolom GnRH- gonadotropin oslobađajući hormon; **hCG-** humani korionski gonadotropin; **FSH-** folikulstimulirajući hormon, **UZ-** ultrazvučna (Preuzeto iz: Sunkara i sur., 2007).



Slika 21. Shematski prikaz kontrolirane stimulacije jajnika tzv. kratkim protokolom GnRH- gonadotropin oslobađajući hormon; **hCG-** humani korionski gonadotropin; **FSH-** folikulstimulirajući hormon; **UZ-** ultrazvuk (Preuzeto iz: Sunkara i sur., 2007).



Slika 22. Shematski prikaz kontrolirane stimulacije jajnika GnRH antagonistom **GnRH-** gonadotropin oslobađajući hormon; **hCG-** humani korionski gonadotropin; **FSH-** folikulstimulirajući hormon; **UZ-** ultrazvuk (Preuzeto iz: Sunkara i sur., 2007).

3. Ispitanici i metode

3.1. Ispitanici

Ovim istraživanjem obuhvaćene su 104 ispitanice uključene u postupak medicinski potpomognute oplodnje metodom ICSI (intracitoplazmatska injekcije spermija) u Poliklinici-IVF Center, Peje, Kosovo, u razdoblju od siječnja 2010, do veljače 2012. godine.

Kriteriji uključenja bili su:

- albanska etnička pripadnost, Dukjagin regija, Republika Kosovo
- dob do 40 godina
- prisutna oba jajnika
- isključenje akutne upalne promjene male zdjelice
- najmanje 6 mjeseci bez hormonske terapije

Isključivši neplodnost, sve pacijentice bile su zdrave, normoovulatorne žene, bez povijesti endokrinoloških bolesti, te bez povijesti obiteljskih nasljednih bolesti.

Uzrok neplodnosti u svim slučajevima bio je muški čimbenik.

Svi pacijenti prije uključivanja u postupak izvantjelesne oplodnje bili su serološki testirani i negativni na protutijela za HIV-1/2 i HCV, kao i na prisustvo HbsAg i antigena na sifilis. Rutinski mikrobiološki i molekularni testovi također su bili negativni. Iz brisa grlića maternice mikrobiološki je analizirano prisustvo aeroba i anaeroba, a metodom PCR prisustvo *Chlamydia trachomatis* i virusa HPVa (Humani papiloma virus), dok su kod partnera isti testovi učinjeni na uzorku sjemena.

Od svih pacijentica pribavljen je potpisani informirani pristanak, a dozvolu za provedeno istraživanje dalo je i etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Prištini, Republike Kosovo.

Nakon upoznavanja sa znanstvenom pozadinom istraživanja, od svake pacijentice uključene u istraživanje uzeti su slijedeći podaci:

- dob
- tjelesna težina i visina, na temelju kojih je određen indeks tjelesne mase (*eng. body mass index, BMI*) kao omjer težine (kg) i kvadrata visine (m^2)
- trajanje menstrualnog ciklusa
- anamneza (opća i ginekološka)
- pušač (da, ne)

- druge vrste terapija (osim terapije vezane uz postupak medicinski potpomognute oplodnje)

Na temelju prikupljenih podataka, tijekom obrade neplodnog para, uključujući i analizu kvalitete sjemena partnera, definirani su uzroci neplodnosti koji su indikacija za liječenje postupkom izvantjelesne oplodnje.

3.2. Prikupljanje uzoraka pune krvi

Svim pacijenticama uključenim u istraživanje uzimana je krv:

- 3. dan menstruacijskog ciklusa, za određivanje bazalne razine hormona (FSH, LH, estradiola, prolaktina, progesterona, TSH i kortizola), te za potrebe izolacije genomske DNA.
- na dan primanja hCG krv je uzeta kako bi se odredila vršna vrijednost estradiola.

Punkcijom iz vene uziman je uzorak od 5 ml pune krvi u epruvete s antikoagulansom (kalijev EDTA). Krv je do daljnje analize pohranjena na -80^0C.

3.3. Određivanje hormona

Metodom ELFA (*eng., enzyme linked fluorescent assay*), na uređaju bioMerieux Mini Vidas Automated Immunoassay Analyzer (bioMérieux S.A. 69280 Marcy l'Etoile, France), određene su serumske koncentracije, slijedeći upute proizvođača:

- FSH (Vidas FSH 30407-01, osjetljivost testa 0.1 mIU/mL)
- LH (Vidas LH 30406-01, osjetljivost testa 0.1 mIU/mL)
- estradiola (Vidas Estradiol II 30431-01, osjetljivost testa 9.0 ng/mL)
- prolaktina (Vidas Prolactin 30410-01, osjetljivost testa 0.5 ng/mL)
- progesterona (Vidas Progesterone 30409-01, osjetljivost testa 0.1 ng/mL)
- TSH (Vidas TSH 30400-01, osjetljivost testa 0.05 μlU/mL)
- kortizola (Vidas Cortisol S 30 451, osjetljivost testa 0.17 ng / mL)

Referentne vrijednosti hormona za folikularnu fazu menstruacijskog ciklusa su: FSH 3.9- 12 mlU/ml; LH 1.5-8.0 mlU/ml; estradiol 18-147 pg /ml; prolaktin 1.3- 25 ng /ml; progesteron

0.10- 0.54 ng /ml; TSH 0.24- 5.0 mlU/ml; kortizol prije podne 55-287 ng /ml i poslijepodne 25- 171 ng / ml.

3.4. Postupak izvantjelesne oplodnje

Kod svih pacijentica postupak kontrolirane hormonske stimulacije jajnika proveden je prema protokolu koji uključuje rekombinantni FSH (rFSH) i GnRH antagonist. Nakon ultrazvučne provjere jajnika 3. dana menstrualnog ciklusa, započeta je hormonska stimulacija s rFSH (Gonal F, Serono, Švicarska) u dnevnoj dozi od 3 do 6 ampula (225-450 IU). Doza je određena za svaku pacijenticu ponaosob, ovisno o dobi, bazalnoj razini hormona, broju antralnih folikula, te BMI. U terapiju je uključen GnRH antagonist (Ganirelix, Orgalutran, NV Organon, Nizozemska) u dozi od 0.25 mg dnevno, od dana kada je vodeći folikul dosegao promjer od 14 mm. Ovulacija je potaknuta davanjem 10 000 IU hCG (Pregnyl ®, NV Organon, Nizozemska) kada su najmanje dva folikula dosegla promjer od 17-18 mm, uz UZV kontrolu promjene endometrija.

Pod blagom sedacijom i analgezijom, ultrazvukom vođena aspiracija folikula vršena je 34-36 sati nakon davanja hCG. Potpora žutom tijelu učinjena je mikroniziranim preparatom progesterona (Utrogestan ®; Besins International, Montrouge, France) od dana aspiracije, a najdulje 8 tjedana, ukoliko je potvrđena trudnoća.

Kultivacija gameta i zametaka vršena je u inkubatorima podešenim na 5,2% CO_2. Sva hraništa pripremljena su dan ranije, kultivacija je vršena u kapima pod uljem. Korišten je potrošni plastični materijal predviđen za IVF postupke (Nunc Art IVF Product Line, Thermo Scientific™), igle za aspiraciju 17G (Ova–Stiff Ovum Aspiration Needle, Cook Medical, Australia), te kateteri za prijenos zametaka Sydney IVF (K-JETS-7019-SIVF, Cook Medical, Australia).

Ejakulat je centrifugiran na gradijentu gustoće 80% i 40% (PureCeption™ Sperm Separation Media, CooperSurgical, SAD), 15 min na 300g, potom dva puta ispran medijem (Quinns Advantage® Sperm Washing Medium, CooperSurgical, SAD), uz centrifugiranje po 7 min na 600g, nakon čega je talog naslojen medijem za oplodnju (Quinns Advantage® Fertilization Medium, CooperSurgical, SAD). Ovako pripremljeno sjeme stavljeno je u inkubator do inseminacije.

Nakon izolacije iz folikularne tekućine, jajne stanice su isprane medijem za oplodnju, granuloza stanice su mehanički uklonjene do korone radijate. Očišćene jajne stanice stavljene su u pripremljene Petrijeve posudice s hraništem (Quinns Advantage® Fertilization

Medium, CooperSurgical, SAD) prekriveno uljem (SAGE Oil for Tissue Culture, CooperSurgical, SAD), inkubirane 3 sata, nakon čega je uslijedio postupak ICSI. U Petrijevim posudicama sa stabiliziranim medijem prekrivenim uljem, prvo su enzimski uklonjene stanice granuloze (Hyaluronidase 80 U/mL in HEPES-HTF, CooperSurgical, SAD), zatim su jajne stanice kroz niz kapi isprane, te stavljene u kapi od 10µl medija za oplodnju (Quinns Advantage® Fertilization Medium, CooperSurgical, SAD) za postupak ICSI. U kapi s polivinilpirolidonom (PVP 7%, CooperSurgical, SAD) dodani su spermiji, te se s granice faza odabirao spermij najboljih kinetičkih i morfoloških karakteristika, imobilizirao i zatim pomoću ICSI mikropipete unosio u citoplazmu jajne stanice. Nakon 16-20 sati vršila se promjena hranilišta (Quinns Advantage® Cleavage Medium, CooperSurgical, SAD) i provjera oplodnje. Nakon 48 sati ponovno se vršila provjera i ocjena razvoja zametaka. Ukoliko se razvilo do dva zametka, prijenos je vršen 3. dan. U slučaju razvoja više od dva zametka, kultivacija je produžena do 5. dana uz promjenu hranilišta (Quinns Advantage® Blastocyst Medium, CooperSurgical, SAD). Razvoj zametaka je provjeravan i ocjenjivan 4. dan. Peti dan, nakon provjere i ocjene, vraćeni su jedan do tri zametka, a preostali zameci zadovoljavajuće kvalitete vitrificirani su (Kitazato Vitrification Kit, Dibimed, Španjolska) i zamrznuti te pohranjeni u tekućem dušiku, prema uputama proizvođača. Ukoliko nije uslijedila trudnoća, nakon procjene liječnika, vršeno je odmrzavanje zametaka (Kitazato Thawing Solutions, Dibimed, Španjolska) i njihov prijenos.

Kao klinički pokazatelj trudnoće uzeto je prisustvo gestacijske vrećice, uz potvrdu srčane aktivnosti fetusa ultrazvukom, 4. tjedna nakon učinjenog prijenosa zametaka.

3.5. Izolacija DNA i genotipizacija

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

Genomska DNA kod svih ispitanica izolirana je iz 250 µl pune krvi korištenjem Whole blood PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (*Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA*), slijedeći upute proizvođača (Slika 23.).

Kvantiteta i kvaliteta izolirane genomske DNA izvršena je mjerenjem apsorbancije DNA uporabom Nanodrop aparata (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA*), slijedeći upute proizvođača.



Slika 23. Shematski prikaz izolacije genomske DNA iz uzoraka pune krvi korištenjem Whole blood PureLink™ Genomic DNA Mini Kita
(Prema: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf)

Prisutnost polimorfizma *Asn*^{680}*Ser (rs6166;*2039G>A) u egzonu 10 gena *FSHR* svake od ispitanica određena je lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (*eng. real-time polymerase chain reaction, real-time PCR, qPCR*) metodom alelne diskriminacije (*eng. TaqMan allelic discrimination assay*). U tu svrhu korišten je komercijalni *TaqMan® SNP Genotyping Assay*-a koji u sebi sadrži gen specifične komercijalne ishodnice (*eng. forward and reverse primers*; nukleotidni slijed poznat proizvođaču) te dvije gen specifične komercijalne TaqMan® nukleotidne sonde (*eng. probe*) obilježene fluorescentnom bojom

VIC® i FAM™ (*FSHR; Asn^{680}Ser; SNP ID rs6166; Assay ID: C___2676874_10; cat. number 4351376; Lot Number: P130805-002H05; Assay Mix Concentration; 40X; Forward Primer Concentration 36 µM; Reverse Primer Concentration 36 µM; concentration of forward and reverse primer: 900 nM, probe concentration: 200 nM FAM™ / VIC® dyes; Context Sequence [VIC/FAM]:AGGGACAAGTATGTAAGTGGAACCA**[C/T]**TGGTGACTCTGGGAC TGAAGAGCA; Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA*).

Pojedina reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu konačnog volumena 25 µL, sadržavala je:

- 1.25 µL TaqMan® SNP Genotyping Assay (razrijeđenje 20X)
- 12.50 µL TaqMan® Universal PCR Master Mix II No AmpErase® UNG (razrijeđenje 2X), (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) te
- 11.25 µL izolata DNA.

Korištenjem uređaja *Applied Biosystems Real-Time PCR System 7500* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu provedena je uz sljedeće reakcijske uvjete:

- početna denaturacija tijekom 10 minuta pri 95° C
- 40 ciklusa denaturacije tijekom 15 sekundi pri 92° C
- spajanja ishodnica i sondi te elongacije tijekom 1 minute pri 60° C.

Svaka reakcija izvršena je u triplikatu a kao kontrola korišteni su DNA uzorci sa poznatim polimorfizmom za ispitivani *SNP Asn^{680}Ser (rs6166;*2039G>A) polimorfizam i negativna kontrola (uzorak bez DNA).
Analiza rezultata i određivanje genotipskih varijanti svake pacijentice izvršena je uz pomoć SDS softvera (*eng, Sequence Detection System*) za alelnu diskriminaciju u skladu s uputama programskog paketa korištenog uređaja *Applied Biosystems Real-Time PCR System 7500* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD).

3.6. Statistička analiza podataka

Prije statističke analize varijable su testirane na normalnu distribuciju uporabom D'Agostino-Pearson omnibus statističkog testa. Varijable su prezentirane kao srednja vrijednost ± SD ako su distribuirane normalno ili kao median i raspon ako su distribuirane neparametrijski. Frekvencije genotipova i alela analizirane su metodom Hi-kvadrat testa ($\chi 2$). Usporedba skupina provedena je nesparenim t testom i testom one-way ANOVA (*eng. analysis of variance*) ili neparametrijskim Kruskal-Wallis (za analizu razlike između većeg broja skupina) i Mann-Whitney testom (usporedba rezultata između dvije skupine) za nesparene podatke. Korelacija između dviju varijabli određena je uporabom linearne regresijske analize Pearsonovog korelacijskog koeficijenta za parametrijski distribuirane varijable dok je Spearmanov korelacijski test korišten za analizu neparametrijskih distribuiranih varijabli. Utjecaj dvaju različitih varijabli na broj prikupljenih jajnih stanica određen je dvostrukim ANOVA testom. Statistička analiza podataka izvršena je uporabom komercijalno dostupnog softvera *GraphPad Prism* (*GraphPad Prism, GraphPad Software, San Diego, CA*). Svi statistički testovi su dvostrani. Vrijednost $P < 0.05$ korištena je za određivanje statističke značajnosti podataka.

4. REZULTATI

U ovom istraživanju genotipizirane su sveukupno 104 ispitanice uključene u postupak izvantjelesne oplodnje metodom ICSI. Praćeni klinički i endokrinološki parametri prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Klinički i endokrinološki parametri istraživane populacije

Klinički i endokrinološki parametri	Vrijednosti
dob (godine)	34 (28-38)
BMI (kg/m^2)	23.25 (20.70-26.10)
duljina trajanja neplodnosti (godine)	4.150 (3.025-5.375)
bFSH (mIU/ml)	10.21 (8.350-12.08)
bLH (mIU/ml)	5.415 (4.688-6.083)
FSH/LH	1.926 (1.720-2.207)
bPRL (ng/ml)	16.41 (10.41-20.58)
bE2 (pmol/l)	40.77 (29.67-57.29)
bP (ng/ml)	0.890 (0.7025-1.163)
bTSH (uIU/ml)	1.780 (1.123-2.435)
kortizol (ng/ml)	123.0 (99.55-170.20)
AFC	6.952 ± 2.031
egzogeni[1] rFSH (IU)	2457 ± 499.0
duljina stimulacije (dani)	12.57 ± 0.897
broj vodećih folikula (d≥14mm) na D-2.[2]	4.327 ± 1.640
estradiol (pg/ml) na D-2.[2]	1791 (1021-2131)
debljina endometrija (mm) na D-2.[2]	8.450 (8.00-8.900)
broj dobivenih jajnih stanica	4.308 ± 1.823
broj prenešenih zametaka	2 (2-3)

Legenda: Vrijednosti su prikazane kao median i raspon za neparametrijski distribuirane varijable, odnosno srednja vrijednost ± SD ako su distribuirane parametrijski.
b je oznaka za bazalnu vrijednost.
[1]egzogeni rFSH (IU): količina potrebna za primjereno hormonsko poticanje jajnika.
[2]D-2: dan primanja hCG za poticanje ovulacije, 36 sati prije aspiracije folikula.

Učestalost *Asn680Ser* genotipskih varijanti *FSHR gena* istraživane populacije prikazane su u tablici 9.

Učestalost je za Asn/Asn iznosila 22.1%, za Asn/Ser 47.1%, te za Ser/Ser 30.8% .

Tablica 9. Genotipizacija *SNP Asn680Ser FSHR* gena 104 ispitanice obuhvaćene istraživanjem

SNP	učestalost alela % (n)		učestalost genotipova % (n)		kliničke trudnoće % (n)
Ser680Asn	**A (N)**	45.67 (95)	AA (NN)	22.12 (23)	43.48 (10)
	G (S)	54.33 (113)	AG (NS)	47.12 (49)	26.53 (13)
			GG (SS)	30.77 (32)	21.87 (7)

Legenda: A - adenin, **G -** gvanin ; **N** - Asparagin, **S** - serin, **NN** - Asparagin/Asparagin, **NS** - Asparagin/Serin, **SS** - Serin/Serin

Klinički i endokrinološki parametri istraživane populacije analizirani su s obzirom na genotipske varijante (Tablica 10), dob ispitanica (Tablica 11), BMI (Tablica 12) i odgovor jajnika na hormonsku stimulaciju (Tablica 13).

Ispitanice su podijeljene u tri skupine ovisno o genotipskom profilu gena za FSHR: ispitanice kod kojih je potvrđen polimorfizam Asn/Asn (NN), Asn/Ser (NS) ili Ser/Ser (SS) (Tablica 10).

Tablica 10. Klinički i endokrinološki parametri ispitanica obzirom na *SNP Asn680Ser* polimorfizam *FSHR* gena

Klinički i endokrinološki parametri	NN (n=23)	NS (n=49)	SS (n=32)	P
dob (godine)	33.65 ± 6.278	34.06 ± 5.528	32.38 ±5.707	0.4308
BMI (kg/m^2)	22.00 (20.60-24.70)*	22.30 (20.20-25.10)**	26.10 (22.88-27.70)*,**	**0.0010**
bFSH (mIU/ml)	10.01 (7.60-12.16)	10.20 (8.58-11.92)	10.28 (8.32-12.18)	0,8530
bLH (mIU/ml)	5.11 (4.56-5.82)	5.56 (4.755-6.370)	5.415 (4.553-5.878)	0.3606
bFSH/bLH	1.976 (1.720-2.256)	1.863 (1.666-2.181)	1.961 (1.754-2.111)	0.6532
bPRL (ng/ml)	14.50 (7.20-20.00)	17.40 (12.02-20.75)	16.41 (9.50-20.58)	0.2403
bE2 (pmol/l)	46.88 (36.75-55.09)	42.90 (34.5-61.20)	33.18 (26.25-45.53)	**0.0308**
bP (ng/ml)	0.740 (0.610-1.080)	1.0 (0.780-1.205)	0.840 (0.6755-1.035))	0.0855
bTSH (uIU/ml)	2.030 (1.14-2.67)	1.76 (1.055-2.43)	1.780 (1.183-2.313)	0.7393
bkortizol (ng/ml)	131.3 (98.00-168.0)	116.0 (99.90-168.3)	147.6 (95.00-182.5)	0.8731
AFC	7.043 ± 1.965	7.122 ± 1.822	6.625 ± 2.379	0.5474
egzogeni[1] rFSH (IU)	2482 ± 467.8	2441 ± 532.7	2466 ± 481.5	0.9444
duljina stimulacije (dani)	12.57 ± 0.6624	12.51 ± 0.8447	12.66 ± 0.8654	0.7336
broj vodećih folikula (d≥14mm) na D-2.[2]	4.565 ± 1.674	4.551 ± 1.542	3.813 ±1.693	0.1020
estradiol (pg/ml) na D-2. [2]	1746 ± 811.0	1782 ± 681.0	1467 ± 627.3	0.1234
endometrija (mm) na D-2. [2]	8.50 (8.00-8.80)	8.40 (8.00-9.00)	8.30 (7.725-8.875)	0.6474
broj dobivenih jajnih stanica	4.174 ±1.946	4.633 ± 1.845	3.906 ± 1.653	0.1997
broj prenešenih zametaka	2 (1-3)	3 (2-3)**	2 (1-2)**	**0.0101**
stopa trudnoće	43.48 (10/23)	26.53 (13/49)	21.875 (7/32)	0.19398

Legenda: Vrijednosti su predstavljene kao srednja vrijednost ± SD ako su distribuirane parametrijski, odnosno kao median i raspon ako su distribuirane neparametrijski. Jednosmjerna ANOVA (Tukey višestruki usporedni test) je korištena za analizu razlika s obzirom na dob, AFC, količinu rFSH , duljina stimulacije, broj vodećih folikula (d≥14mm) na D-2., E2 na D-2., broj dobivenih jajnih stanica i broj prenešenih zametaka. Hi-kvadrat analiza korištena je za analizu trudnoće. Kruskal-Wallisov kao i Dunnov višestruki usporedni test korišten je za analizu razlika neparametrijskih varijabli. Vrijednost $P<0.05$ smatrana je statistički značajnom.

*, ** vrijednosti koje se značajno razlikuju između skupina (Dunnov višestruki usporedni test –vidi objašnjenje u tekstu). NN – Asn/ASn , NS – Asn/Ser, SS - Ser/Ser; b je oznaka za bazalnu vrijednost; [1]egzogeni FSH (IU): količina potrebna za primjereno hormonsko poticanje jajnika; [2]D-2: dan primanja hCG za poticanje ovulacije 36 sati prije aspiracije folikula

Kao što je vidljivo iz tablice 10., srednje vrijednosti dobi ispitanica iz sve tri skupine, određene prema prisutnosti neke od ispitivanih genotipskih varijanti, bile su slične. Isto tako, bazalne vrijednosti FSH, LH, FSH/LH, PRO, P, TSH i kortizola nisu pokazale statistički uočljive razlike unutar navedenih skupina. Statistički značajne razlike također nisu bile uočene ni za AFC, količinu egzogenog rFSH, trajanje stimulacije, broj vodećih folikula, broj prikupljenih jajnih stanica i debljinu endometrija.

Premda je sveukupna analiza bazalne razine E2 unutar tri ispitivane skupine pokazala statistički značajnu razliku (Krukal-Wallis test, P= 0.0308), P vrijednosti dobivene analizom, koristeći Dunnov višestruki usporedni test, nisu pokazale statističku značajnost (Asn/Ser vs. Asn/Asn, P > 0.999; Ser/Ser vs. Asn/Asn, P = 0.0747; Ser/Ser vs. Asn/Ser, P= 0.0600).

Sveukupna analiza BMI unutar tri ispitivane skupine pokazala je statistički značajnu razliku (P= 0.0010). Dodatna analiza primjenom Dunnova višestrukog usporednog testa (rezultati statističke analize Dunnovog testa su naznačeni zvjezdicom, ali vrijednosti nisu prikazane u tablici 11), međusobne usporedbe pojedinih genotipskih varijanti (Asn/Ser vs. Asn/ASn; Ser/Ser vs. Asn/Asn; Ser/Ser vs. Asn/Ser) pokazala je da je BMI značajno veći kod ispitanica sa Ser/Ser genotipskom varijantom u usporedbi s ispitanicama s Asn/Ser (Dunnov višestruki usporedni test, P= 0.0152) i Asn/Asn genotipskom varijantom (Dunnov višestruki usporedni test, P= 0.0014). Između ispitanica s Asn/Ser i Asn/Asn s genotipskom varijantom nisu primjećene statistički značajne razlike u BMI (Dunnov višestruki usporedni test, P > 0.999).

Sveukupna analiza broja prenešenih zametaka unutar tri ispitivane genotipske skupine također je pokazala statistički značajnu razliku (Krukal-Wallis test, P= 0.0101). Dodatnom primjenom Dunnova višestrukog usporednog testa (rezultati statističke analize Dunnovog testa su naznačeni zvjezdicom, ali vrijednosti nisu prikazane u tablici 11), pokazala se statistički značajna razlika između ispitanica sa Ser/Ser varijantom, gdje je prenešeno manje zametaka u usporedbi s ispitanicama s Asn/Ser varijantom. Između ispitanica s Asn/Ser varijantom u usporedbi s ispitanicama s Asn/Asn varijantom (Dunnov višestruki usporedni test, P= 0.8446), te ispitanica sa Ser/Ser varijantom u usporedbi s ispitanicama s Asn/Asn varijantom (Dunnov višestruki usporedni test, P= 0.3821) nisu uočene statistički značajne razlike.
Obzirom na dob, ispitanice su podijeljene u tri skupine: ispitanice u dobi do 32 godine, ispitanice u dobi između 32 i 36 godina, te ispitanice u dobi iznad 36 godina (Tablica 11).

Tablica 11. Klinički i endokrinološki parametri obzirom na dob ispitanica

Klinički i endokrinološki parametri	Skupina I (<32) n=37	Skupina II (32-36) n=35	Skupina III (>36) n=32	P
BMI (kg/m^2)	23.83 ± 3.283	24.00 ± 3.20	23.11 ± 3.634	0.5235
bFSH (mIU/ml)	9.870 (7.965-11.15)	10.02 (8.20-12.03)	10.65 (9.805-12.55)	0.0969
bLH (mIU/ml)	5.120 (4.270-5.810)	5.410 (4.80-6.950)	5.590 (4.890-6.163)	0.2038
bFSH/bLH	1,959 (1.7908-2.242)	1.779 (1.558-2.097)	1.946 (1.761-2.232)	0.0843
bPRL (ng/ml)	15.30 (11.05-22.10)	17.40 (8.30-20.70)	15.60 (10.25-20.05)	0.7304
bE2 (pmol/l)	39.10 (28.75-48.51)	41.70 (30.20-57,20)	47.00 (30.70-67.78)	0.3673
bP (ng/ml)	0,820 (0.650-1.080)	0,910 (0.70-1.120)	0,90 (0.780-1.225)	0.6779
bTSH (uIU/ml)	1.637 ± 0.7061	2.049 ± 0.8150	1.775 ± 0.8099	0.0789
bkortizol (ng/ml)	141.0 (104.1-176.5)	117.8 (98.60-161.4)	123.0 (99.55-169.2)	0.6643
AFC	7.703 ± 2.308^{a**}	7.029 ± 1.902	6.00 ± 1.391^{a**}	**0.0018**
egzogeni[1] rFSH (IU)	2250 (1763-2625) $^{****/*}$	2400 (2400-3000) *	2775 (2400-3000) ****	**<0.0001**
duljina stimulacije (dani)	12.24 ±0.8946	12.60 ± 0.6945**	12.91 ± 0.6891**	**0.0024**
broj vodećih folikula (d≥14mm) na D-2.[2]	4.514 ± 1.592	4.571 ± 1.754	3.844 ± 1.505	0.1328
E2 (pg/ml) na D-2.[2]	1864 ± 651.8**	1796 ± 710.6*	1331 ± 645.8$^{**/*}$	**0.0028**
endometrij (mm) na D-2.[2]	8.70 (8.20-9.450)**	8.50 (8.00-9.00)	8.150 (7.80-8.50)**	**0.0090**
broj dobivenih jajnih stanica	4.919 ± 1.862***	4.514 ± 1.704*	3.375 ± 1.561$^{***/*}$	**0.0011**
broj prenešenih zametaka	2.514 ± 0.6065***	2.314 ± 0.7581*	1.844 ± 0.7233$^{***/*}$	**0.0005**
stopa trudnoće	35.14% (13/37)	34.29% (12/35)	15.625% (5/32)	0.139457

Legenda: Vrijednosti su predstavljene kao srednja vrijednost ± SD ako su distribuirane parametrijski, odnosno kao median i raspon ako su distribuirane neparametrijski. Jednosmjerna ANOVA (Tukey višestruki usporedbeni test) je korištena za analizu razlika s obzirom na BMI, bTSH, AFC, duljinu stimulacije (dani), broj vodećih folikula (d≥14mm) na D-2, E2 (pg/ml) na D-2., broj dobivenih jajnih stanica i broj prenešenih zametaka . Hi-kvadrat analiza korištena je za analizu trudnoće. Kruskal-Wallisov test i Dunnov višestruki usporedbeni testi korišteni su za analizu razlika neparametrijskih varijabli. Vrijednost P<0.05 smatrana je statistički značajnom.

$^{**/***/*}$vrijednosti koje se značajno razlikuju između skupina (Tukey odnosno Dunnov višestruki usporedni test -vidi objašnjenje u tekstu).

b je oznaka za bazalnu vrijednost; [1]egzogeni rFSH (IU): količina potrebna za primjereno hormonsko poticanje jajnika; [2]D-2: dan primanja hCG za poticanje ovulacije 36 sati prije aspiracije folikula

Prema rezultatima navedenim u tablici 11., unutar ispitivanih skupina, određenih prema dobi ispitanica, nisu nađene statistički značajne razlike između BMI, bazalne razine hormona, kao ni između broja vodećih folikula. Međutim, vrijednosti AFC (jednosmjerna ANOVA, P= 0.0018), količine egzogenog rFSH (Kruskal-Wallisov test, P <0.0001), duljine trajanja stimulacijskog protokola (jednosmjerna ANOVA, P= 0.0024), debljine endometrija na dan primanja hCG-a (Kruskal-Wallisov test, P= 0.0090), te vršne vrijednosti E2 (jednosmjerna ANOVA, P= 0.0028), kao i broja dobivenih jajnih stanica (jednosmjerna ANOVA, P= 0.0011) i prenešenih zametaka (jednosmjerna ANOVA, P= 0.0005) pokazale su statistički značajne razlike unutar skupina.

Rezultati pokazuju da dolje navedeni parametri mjereni kod dobne skupine III, u koju su svrstane najstarije ispitanice (iznad 36 godina starosti), pokazuju odstupanja od parametara skupina I i II, u koje su svrstane mlađe ispitanice (do 36 godina starosti):

- primjenom Tukey višestrukog usporednog testa, pokazalo se da je razina AFC statistički značajno manja u skupini III u odnosu na skupinu I (P= 0.0012)
- primjenom Dunn-ovog višestrukog usporednog testa pokazalo se da je količina egzogenog rFSH potrebnog za stimulaciju jajnika značajno veća u dobnoj skupini III u usporedbi sa skupinom II (P <0.0001) i skupinom I (P=0.0396).
- primjenom Tukey višestrukog usporednog testa, nađeno je da je duljina trajanja stimulacijskog postupka značajno duža u skupini III u odnosu na skupinu I (P=0.0016)
- primjenom Tukey višestrukog usporednog testa, pokazano je da su vršne vrijednosti E2 statistički značajno niže u skupini III u usporedbi sa skupinom I (P=0.0039), odnosno skupinom II (P= 0.0152).
- primjenom Dunn-ovog višestrukog usporednog testa, pokazalo se da je debljina endometrija statistički značajno manja u skupini III u usporedbi sa skupinom I (P= 0.0065)
- primjenom Tukey višestrukog usporednog testa, nađeno je da je broj dobivenih jajnih stanica statistički značajno niži u skupini III u usporedbi sa skupinom I (P= 0.0010), odnosno skupinom II (P= 0.0215).
- primjenom Tukey višestrukog usporednog testa, uočen je statistički značajno veći broj prenešenih zametaka u skupini III u usporedbi sa skupinom I (P= 0.0004), odnosno skupinom II (P= 0.0186).

Obzirom na BMI, ispitanice su podijeljene u dvije skupine, indeks 25 bila je vrijednost razgraničenja (Tablica 12).

Tablica 12. Klinički i endokrinološki parametri ispitanica obzirom na BMI

Klinički i endokrinološki parametri	BMI≤25 n=69	BMI>25 n=35	P
Dob (godine)	34(28-39)	33 (27-36)	0.3994
bFSH (mIU/ml)	10.20 (8.730-12.13)	10.22 (8.320-11.81)	0.9386
bLH (mIU/ml)	5.320 (4.695-5.905)	5.440 (4.620-6.710)	0.5097
bFSH/bLH	1.911 (1.732-2.193)	1.956 (1.657-2.229)	0.8556
bPRL (ng/ml)	14.58 (10.15-19.86)	19.00 (11.40-22.40)	**0.0404**
bE2 (pmol/l)	40.90 (30.90-57.38)	40.64 (28.70-57.20)	0.7987
bP (ng/ml)	0.8600 (0.6750-1-155)	0.950 (0.770-1.20)	0.3683
bTSH (uIU/ml)	1.813 ± 0.8185	1.828 ± 0.7365	0.9291
bkortizol (ng/ml)	119.4 (99.90-168.9)	140.0 (94.70-179.0)	0.7567
AFC	6.826 ± 2.10	7.200 ± 1.891	0.3618
egzogeni[1] rFSH (IU)	2471 ± 497.2	2430± 508.8	0.6942
duljina stimulacije (dani)	12.65 ± 0.7826	12.40 ± 0.8471	0.1462
broj vodećih folikula (d≥14mm) na D-2.[2]	4.304 ± 1.683	4.371 ± 1.573	0.8415
E2 (pg/ml) na D-2.[2]	1650 (1016-2108)	1948 (1092-2150)	0.3468
endometrij (mm) na D-2.[2]	8.50 (8.00-8.80)	8.40 (7.90-9.10)	0.9658
broj dobivenih jajnih stanica	4.174 ± 1.806	4.571 ± 1.852	0.2955
broj prenešenih zametaka	2 (2-3)	2 (2-3)	0.6335
stopa trudnoća	28.985 % (20/69)	28.57 % (10/35)	0.96487

Legenda: Vrijednosti su predstavljene kao srednja vrijednost ± SD ako su distribuirane parametrijski, odnosno kao median i raspon ako su distribuirane neparametrijski. T test za nepovezane uzorke korišten je za analizu razlika parametrijskih varijabli a Mann-Whitney test korišten je za analizu razlika neparametrijskih varijabli. Hi-kvadrat analiza korištena je za analizu trudnoće. Vrijednost $P<0.05$ smatrana je statistički značajnom. Vrijednost $P<0.05$ smatrana je statistički značajnom.

b je oznaka za bazalnu vrijednost.

[1]egzogeni FSH (IU): količina potrebna za primjereno hormonsko poticanje jajnika

[2]D-2: dan primanja hCG za poticanje ovulacije, 36 sati prije aspiracije folikula

Osim značajno povišene bazalne razine prolaktina (Mann-Whitney test, P= 0.0404) u skupini s BMI ≥ 25), između dviju promatranih BMI skupina nije nađena statistički značajna razlika, za bilo koji drugi ispitivani parametar.

Prema odgovoru na hormonsku stimulaciju jajnika, ispitanice su podijeljene u dvije skupine: one sa slabim odgovorom („low responders“) kod kojih je dobiveno manje ili najviše 5 jajnih stanica, te one sa urednim odgovorom kod kojih je dobiveno 6 i više jajnih stanica (Tablica 13).

Prema rezultatima prikazanim u tablici 13, BMI i bazalne razine hormona (osim FSH) nisu pokazale statistički značajnu razliku unutar ispitivanih skupina. Ispitanice s urednim odgovorom na stimulaciju jajnika imale su statistički značajno nižu bazalnu razinu FSH (Mann-Whitney test, P= 0.0069) u krvi.

Kod ispitanica sa slabim odgovorom na hormonsku stimulaciju jajnika nađene su statistički značajno više vrijednosti za dob ispitanica (Mann-Whitney test, P=0,0075), količinu egzogenog rFSH potrebnog za stimulaciju jajnika (T test za nepovezane uzorke, P=<0.0001 za obje varijable) te za duljinu trajanja stimulacije (T test za nepovezane uzorke, P=<0.0001 za obje varijable).

Vrijednosti razine AFC (Mann-Whitney test, P <0.0001), broja vodećih folikula (T test za nepovezane uzorke, P=<0.0001 za obje varijable), razine vršnog estradiola (Mann-Whitney test, P <0.0001), debljine endometrija (Mann-Whitney test, P <0.0001), te broja prenesenih zametaka (Mann-Whitney test, P <0.0001) i stope trudnoća (Hi-kvadrat test, P= 0.000111) bile u skupini ispitanica sa slabim odgovorom na hormonsku stimulaciju jajnika statistički značajno niže u odnosu na ispitanice s urednim odgovorom na stimulaciju.

Tablica 13. Klinički i endokrinološki parametri ispitanica s obzirom na broj dobivenih jajnih stanica

Klinički i endokrinološki parametri	SLAB ODGOVOR (≤5) n=76	UREDAN ODGOVOR (6-10) n=28	p
Dob (godine)	34 (30-39.75)	31.50 (27-35)	**0.0075**
BMI (kg/m^2)	23.10 (20.70-26.10)	24.10 (20.68-26.25)	0.6872
bFSH (mIU/ml)	10.51 (8.872-12.19)	9.250 (7.278- 10.40)	**0.0069**
bLH (mIU/ml)	5.440 (4.820-5.998)	5.160 (4.245-6.350)	0.5011
bFSH/bLH	1.930 (1.754-2.207)	1.866 (1.566-2.218)	0.1620
bPRL (ng/ml)	14.89 (10.13-20.68)	17.42 (13.48-20.20)	0.2259
bE2 (pmol/l)	39.80 (28.96-56.40)	41.89 (29.95-76.45)	0.1852
bP (ng/ml)	0.8450 (0.6725-1.163)	0.910 (0.780-1.193)	0.2645
bTSH (uIU/ml)	1.80 (1.123-2.435)	1.750 (1.005-2.608)	0.7693
bkortizol (ng/ml)	119.8 (98.75-170.2)	139.5 (102.9-177.0)	0.6659
AFC	6.434 ± 1.928	8.357 ± 1.615	**<0.0001**
egzogeni[1] rFSH (IU)	2625 (2400-3000)	1950 (1725-2400)	**<0.0001**
duljina stimulacije (dani)	12.79 ± 0.7177	11.96 ± 0.7445	**<0.0001**
broj vodećih folikula (d≥14mm) na D-2.[2]	3.855 ± 1.439	5.607 ± 1.474	**<0.0001**
E2 (pg/ml) na D-2.[2]	1505 (906.5-1905)	2179 (2025-2638)	**<0.0001**
endometrij (mm) na D-2.[2]	8.20 (7,90-8.675)	9.0 (8,50-9,80)	**<0.0001**
broj dobivenih jajnih stanica	4 (3-5)	6 (6-6.75)	**<0.0001**
broj prenešenih zametaka	2 (1,250-3)	3 (3-3)	**<0.0001**
stopa trudnoća	18.42 % (14/76)	57.14 % (16/28)	**0.000111**

Legenda: Vrijednosti su predstavljene kao srednja vrijednost ± SD ako su distribuirane parametrijski, odnosno kao median i raspon ako su distribuirane neparametrijski. T test za nepovezane uzorke korišten je za analizu razlika parametrijskih varijabli a Mann-Whitney test korišten je za analizu razlika neparametrijskih varijabli. Hi-kvadrat analiza korištena je za analizu trudnoće. Vrijednost P<0.05 smatrana je statistički značajnom. b je oznaka za bazalnu vrijednost; [1]egzogeni FSH (IU): količina potrebna za primjereno hormonsko poticanje jajnika; [2]D-2: dan primanja hCG za poticanje ovulacije 36 sati prije aspiracije folikula

U tablici 14. prikazana je učestalost genotipskih varijanti alela gena *FSHR* prema dobnim skupinama, kao i prema odgovoru ispitanica na stimulaciju jajnika koji je vrednovan prema broju dobivenih jajnih stanica tijekom aspiracije folikula.

Tablica 14. Učestalost genotipskih varijanti alela *FSHR* gena s obzirom na dobne skupine i odgovor na stimulaciju jajnika

Genotip	Skupina I (<32) n (%)	Skupina II (32-36) n (%)	Skupina III (>36) n (%)	P (χ^2 test)	Slab odgovor n (%)	Uredan odgovor n (%)	P (χ^2 test)
NN	9 (24.33)	5 (14.29)	9 (28.125)		16 (21.05)	7 (25)	
NS	14 (37.84)	20 (57.14)	15(46.875)		35 (46.05)	14 (50)	
SS	14 (37.84)	10 (28.57)	8 (25)		25 (32.89)	7 (25)	
Ukupno	n=37	n=35	n=32	0.4061	n=76	n=28	0.73124991

Legenda: Hi-kvadrat analiza. P<0.05 statistički signifikantan, **N** - Asparagin, **S**- serin, **NN** – Asparagin/Asparagin, **NS** – Asparagin/Serin, **SS** – Serin/Serin

Kao što je vidljivo u tablici 14., analizom učestalosti genotipskih varijanti kroz dobne skupine ispitanica nije nađena značajna razlika u njihovoj raspodjeli (Hi-kvadrat test, P = 0.4061). Također, raspodjela navedenih varijanti nije pokazivala razlike u raspodjeli između ispitanica razvrstanih prema odgovoru na hormonsku stimulaciju jajnika (Hi-kvadrat test, P = 0.73124991).

Kako bi se ispitalo postoji li razlika u broju jajnih stanica između ispitanica s različitim genotipom za SNP Asn^{680}/Ser^{680} ukoliko se u obzir uzme i utjecaj dobi, BMI, bazalne koncentracije FSH i omjera bFSH/bLH, učinjena je dvofaktorska ANOVA analiza, te je ispitano postoji li međusobna interakcija dva čimbenika od nabrojenih, na broj dobivenih jajnih stanica (Tablica 15).

U prvom je koraku ispitan zajednički utjecaj genotipa i dobi ispitanica na broj dobivenih jajnih stanica, te nije uočena statistički značajna interakcija. Sljedećim analizama ispitan je utjecaj genotipa i BMI na broj dobivenih jajnih stanica, kao i utjecaj genotipa i bazalne koncentracije FSH te utjecaj genotipa i omjera bazalnih koncentracija FSH i LH (bFSH/bLH) na broj dobivenih jajnih stanica, te također nije uočena statistički značajna interakcija.

Prema razini bazalne koncentracije FSH, ispitanice su podjeljene u 2 skupine čija je bazalna koncentracija FSH bila ≤10 IU/L, odnosno >10 IU/L. Dvofaktorskom ANOVA analizom nije

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

Tablica 15. Međuovisnost genotipa *SNP Asn^{680}/Ser^{680}* te dobi ispitanica, BMI, bFSH i bFSH/bLH na broj dobivenih jajnih stanica

Genotip	NN			NS			SS			P
	Medijan	**SD**	**n**	**Medijan**	**SD**	**n**	**Medijan**	**SD**	**n**	
dob										0.2980
<32	5.111	1.616	9	5.429	1.989	14	4.286	1.816	14	
32-36	5.00	1.225	5	4.88	1.666	25	3.60	1.506	10	
>37	2.778	1.856	9	3.600	1.352	15	3.625	1.598	8	
BMI										0,1110
≤ 25 kg/m^2	3.850	1.814	20	4.528	1.781	36	3.692	1.797	13	
> 25 kg/m^2	6.333	1.528	3	4.923	2.060	13	4.053	1.580	19	
bFSH										0.7738
≤ 10	4.818	1.888	11	5.130	1.984	23	4.786	1.578	14	
> 10	3.583	1.881	12	4.192	1.625	26	3.222	1.396	18	
bFSH/bLH										0.3342
≤ 2.5	4.19	2.015	21	4.761	1.779	46	4.308	1.490	26	
> 2.5	4.00	1.414	2	2.667	2.082	3	2.167	1.169	6	

Legenda: Prikazane su median + SD, a za usporedbu je korišten dvofaktorski ANOVA test. P<0.05 statistički signifikantan

Kako bi se ispitalo postoji li međuovisnost kliničkih i endokrinoloških parametara i broja dobivenih janih stanica, učinjena je linearna regresijska analiza (Tablica 16). Kao što je vidljivo u tablici 16, korelacijska analiza određivanih parametara s brojem dobivenih jajnih stanica pokazala je statistički izuzetno značajnu (P< 0.0001) negativnu korelaciju u odnosu na dob ispitanica (r= -0.3904), vrijednosti bFSH (r= -0.1940), duljinu stimulacije (r= -0.6918) i količinu egzogenog rFSH potrebnog za stimulaciju jajnika (r= -0.6369).

S druge strane, vrijednosti za AFC (r= 0.7123), broj prenešenih zametaka (r= 0.7664) kao i broj vodećih folikula (d≥14mm) (r= 0.7263) i vršne vrijednosti E2 (r=0.8092) te debljina endometrija (r=0.6305) na dan primanja hCG, pokazuju statistički značajnu (P< 0.0001)

pozitivnu korelaciju sa brojem dobivenih oocita (Tablica 16).

Najjača međuovisnost između broja jajnih stanica i ispitivanih parametara dokazana je za vršne vrijednosti E2 na dan administracije hCG (r = 0.8092) i broja prenešenih zametaka (r = 0.7664), uz statističku značajnost P < 0.0001.

Tablica 16. Usporedba kliničkih i endokrinoloških parametara s odgovorom na hormonsku stimulaciju jajnika

Klinički i endokrinološki parametri	Broj jajnih stanica	
	r	**p**
Dob (godine)	**-0.3904** Spearman	**< 0.0001**
BMI (kg/m^2)	0.1010 Spearman	0.3078
bFSH (mIU/ml)	**-0.4037** Spearman	**< 0.0001**
bLH (mIU/ml)	**-0.1940** Spearman	**0.0484**
bFSH/bLH	**-0.2484** Spearman	**0.0114**
bPRL (ng/ml)	**0.2386** Spearman	**0.0147**
bE2 (pmol/l)	**0.2722** Spearman	**0.0052**
bP (ng/ml)	**0.2941** Spearman	**0.0024**
bTSH (uIU/ml)	-0.04629 Spearman	0.648
bkortizol (ng/ml)	0.005915 Spearman	0.9525
AFC	**0.7123** Pearson	**< 0.0001**
egzogeni[1] rFSH (IU)	**-0.6369** Pearson	**< 0.0001**
duljina stimulacije (dani)	**-0.6918** Pearson	**< 0.0001**
broj vodećih folikula (d≥14mm) na D-2.[2]	**0.7263** Pearson	**< 0.0001**
E2 (pg/ml) na D-2.[2]	**0.8092** Spearman	**< 0.0001**
endometrij (mm) na D-2.[2]	**0.6305 Spearman**	**< 0.0001**
broj prenešenih zametaka	**0.7664 Spearman**	**< 0.0001**

Legenda: Jačina veze između varijabli testirana je Pearson odnosno Spearman korelacijskom analizom. P<0.05 statistički značajno

Promatrana je i veza ispitivanih parametara s brojem dobivenih jajnih stanica u skupinama ispitanica podijeljenih na osnovi genotipa za *SNP* Asn^{680}/Ser^{680} (Tablica 17).

Tablica 17. Usporedba kliničkih i endokrinoloških parametara s odgovorom na hormosnku stimulaciju jajnika u odnosu na *SNP Asn680Ser* genotipske varijante *FSHR* gena

Klinički i endokrinološki parametri	NN (n=23)		NS (n=49)		SS (n=32)	
	r	**p**	**r**	**p**	**r**	**p**
Dob (godine)	**-0.5175** Pearson	**0.0044**	**-0.4614** Pearson	**0.0008**	-0.2731 Pearson	0.1304
BMI (kg/m^2)	-0.04402 Spearman	0.8419	0.1905 Pearson	0.1899	0.1334 Pearson	0.4667
bFSH (mIU/ml)	-0.3822 Spearman	0.0719	-0.2778 Spearman	0.0533	**-0.6047** Spearman	**0.0002**
bLH (mIU/ml)	-0.2240 Spearman	0.3024	-0.03079 Spearman	0.8337	**-0.4798** Spearman	**0.0055**
bFSH/bLH	-0.08661 Pearson	0.6944	-0.1694 Spearman	0.2447	**-0.4972** Spearman	**0.0044**
bPRL (ng/ml)	**0.4685** Spearman	**0.0241**	0.04528 Spearman	0.7574	0.2966 Pearson	0.0933
bE2 (pmol/l)	**0.4532** Spearman	**0.0299**	0.05245 Pearson	0.7204	**0.5537** Spearman	**0.0010**
bP (ng/ml)	0.3595 Spearman	0.0921	0.06386 Pearson	0.6629	**0.5709** Spearman	**0.0006**
bTSH (uIU/ml)	-0.1371 Spearman	0.5326	0.004856 Pearson	0.9736	0.01506 Pearson	0.9348
bkortizol (ng/ml)	0.04413 Pearson	0.8415	0.07726 Spearman	0.5977	-0.1786 Spearman	0.3281
AFC	**0.8062** Pearson	**<0.0001**	**0.6770** Pearson	**<0.0001**	**0.7207** Pearson	**< 0.0001**
egzogeni[1] rFSH (IU)	**-0.5706** Pearson	**0.0045**	**-0.6851** Pearson	**<0.0001**	**-0.6273** Pearson	**0.0001**
duljina stimulacije (dani)	**-0.6792** Pearson	**0.0004**	**-0.7061** Pearson	**<0.0001**	**-0.6997** Pearson	**< 0.0001**
broj vodećih folikula (d≥14mm) na D-2.[2]	**0.8336** Pearson	**<0.0001**	**0.6731** Pearson	**<0.0001**	**0.7196** Pearson	**< 0.0001**
E2 (pg/ml) na D-2.[2]	**0.7928** Pearson	**<0.0001**	**0.7517** Pearson	**<0.0001**	**0.9016** Pearson	**< 0.0001**
endometrij (mm) na D-2.[2]	**0.7403** Pearson	**<0.0001**	**0.5372** Spearman	**<0.0001**	**0.6867** Pearson	**< 0.0001**
broj prenešenih zametaka	**0.8817** Spearman	**<0.0001**	**0.6467** Pearson	**<0.0001**	**0.8129** Pearson	**< 0.0001**

Legenda: Jačina veze između varijabli testirana je Pearson odnosno Spearman korelacijskom analizom. P<0.05 statistički značajan.

Iz rezultata prikazanih u tablici 17 proizilazi da su vrijednosti za razinu AFC, vršni E2 uz broj vodećih folikula (d≥14mm) i debljinu endometrija na dan davanja hCG, te broj prenešenih zametaka u pozitivnoj korelaciji sa sva tri ispitivana genotipa.

Vrijednosti za količnu egzogenog rFSH potrebnog za stimulaciju jajnika, te duljinu trajanja stimulacije, u negativnoj su korelaciji sa sva tri ispitivana genotipa.

U skupini ispitanica s genotipom NN (Asn/Asn) u statistički značajnoj negativnoj korelaciji s brojem dobivenih jajnih stanica je dob ispitanica (r= -0.5175; P=0.0044), a u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji su bazalne vrijednosti prolaktina (r=0.4685, P= 0.0241) i E2 (r=0.4532, P= 0.0241).

U skupini ispitanica s genotipom NS (Asn/Ser) u statistički značajnoj negativnoj korelaciji s brojem dobivenih jajnih stanica je dob (r= -0.4614, P=0.0008).

U skupini ispitanica s genotipom SS (Ser/Ser) u statistički značajnoj negativnoj korelaciji s brojem dobivenih jajnih stanica su bazalne vrijednosti FSH (r= -0.6047, P =0.0002), LH (r = 0.4798, P= 0.0055), omjer FSH i LH (r= -0.4972, P=0.0044), dok su u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji bazalna razina E2 (r= 0.5537, P= 0.0010) i progesterona (r=0.5709, P= 0.0006).

5. RASPRAVA

U ovom radu istražili smo raspodjelu Asn680Ser polimorfizma gena *FSHR* u populaciji albanskih žena iz Dukjagin regije Republike Kosovo, uključenih u postupak izvantjelesne oplodnje.

FSHR je sastavni dio membrane granuloza stanica. Mutacije gena su rijetke, ali su polimorfizmi pojedinačnih nukleotida uobičajeni. Većina polimorfizama nalazi se u intronima i nemaju učinak na aktivnost receptora. Dva najčešća polimorfizma u kodirajućoj regiji gena FSHR nalaze se u eksonu 10 (Asn680Ser i Ala307Thr), točnije u proteinskoj domeni koja nema ulogu u vezanju FSH već je neophodna za provođenje signala. Varijanta Asn680Ser je visoko polimorfna, gdje učestalost heterozigotnih varijanti varira između 0,311-0,523, ovisno o istraživanoj populaciji.

Kuijper i suradnici (2011) proveli su istraživanje na 1771 ispitanici uključenoj u postupak medicinski potpomognute oplodnje. Ispitanice su bile podijeljene prema porijeklu na azijsku, euroazijsku, mediteransku, hindu i kreolsku skupinu. Autori su pokazali da je u euroazijskoj skupini zastupljenost heterozigotne varijante Asn/Ser bila 48,9%, dok je za homozigotne varijante Asn/Asn i Ser/Ser iznosila 29,6% i 21,5%. Nadalje, autori iznose da je za mediteransku populaciju zastupljenost heterozigotne varijante 51,4%, dok je zastupljenost homozigotnih varijanti Asn/Asn 26,3% i Ser/Ser 22,3%. Sličnu raspodjelu kod euroazijskih ispitanica, uključenih u postupak izvantjelesne oplodnje s tubarnim ili muškim čimbenikom neplodnosti, opisali su i drugi autori (Perez Mayorga i sur., 2000). Raspodjela varijanti *FSHR* gena kod ispitanica s redovitim menstrualnim ciklusom i bez znakova neplodnosti (Greb i sur., 2005) podudara se s nalazima neplodnih ispitanica uključenih u postupak medicinski potpomognute oplodnje (Kuijper i sur., 2011; Perez Mayorga i sur., 2000; Laven i sur, 2003). Iz navedenog proizlazi zaključak da se raspodjela genotipskih varijanti za *FSHR* unutar populacije plodnih i neplodnih ispitanica ne razlikuje, te je skupina ispitanica uključenih u postupak medicinski potpomognute oplodnje relevantna skupina za istraživanje etničke raspodjele genotipskih varijanti za *FSHR*.

Našim istraživanjem pokazalo se da je Asn/Ser genotipska varijanta dominantna po učestalosti u istraživanoj populaciji i zastupljena s 47,12%, što je u skladu s nalazima za

euroazijsku populaciju. Navedena genotipska varijanta prisutna je kao dominantna i u drugim etničkim skupinama diljem svijeta (Perez Mayorga i sur., 2000; Sudo i sur., 2002; Jun i sur., 2006; Kuijper i sur., 2011; Mohiyiddeen i sur., 2012).

Međutim, potrebno je naglasiti da je u ispitivanoj populaciji albanskih žena genotipska varijanta Ser/Ser zastupljena s 30,77% i pokazala se učestalijom u odnosu na Asn/Asn homozigotnu varijantu koja je zastupljena s 22,12%. Ovaj nalaz pokazuje različitost od literaturnih podataka o raspodjeli navedenih genotipskih varijanti za euroazijsku i za mediteransku skupinu, te predstavlja specifičnost za albansku populaciju (Perez Mayorga i sur., 2000; Sudo i sur., 2002; Jun i sur., 2006; Kuijper i sur., 2011; Mohiyiddeen i sur., 2012).

Po svemu sudeći, zatvorenost albanske populacije koja se očituje niskom učestalošću stupanja u bračnu zajednicu s pripadnicima drugih etničkih skupina, mogla bi biti razlogom utvrđene razlike u raspodjeli navedenih *SNP* polimorfizama gena *FSHR*, u odnosu na druge etničke skupine. Čini se da su sociološke i kulturološke posebnosti očuvale ishodni genetski „pool“, koji svoje korijene vuče još od starosjedilačke autohtone populacije.

Svrha ovog rada bila je ispitati zastupljenost pojedinih genotipskih varijanti koje kodiraju za receptor hormona FSH u populaciji albanskih žena. Obzirom da su ispitanice bile uključene i u postupak izvantjelesne oplodnje, bili smo u mogućnosti istražiti da li pojedina genotipska varijanta pokazuje posebnosti vezano uz fiziološku razinu hormona hipofize i jajnika, te uz vrijednosti AFC i BMI. Također, bili smo u mogućnosti posredno pratiti da li je pojedina genotipska varijanta povezana s odgovorom jajnika na hormonsku stimulaciju. Ispitanice su dobivale rekombinantni FSH kako bi se izazvala dodatna stimulacija jajnika i time potaknuo veći broj folikula na dozrijevanje. Putem potrebne doze rFSH i duljine stimulacije, broja vodećih folikula, broja dobivenih jajnih stanica, kvalitete zametaka, debljine endometrija, te ishodom postupka izvantjelesne oplodnje promatrali smo da li su u vrijednostima navedenih parametara prisutne razlike u odnosu na genotipske varijante gena *FSHR*.

Farmakogenetičke studije otkrile su velik broj genskih biljega uključenih u fiziološke procese koji utječu na rezervu jajnika i reproduktivni vijek žena, te opisale njihov utjecaj na odgovor ispitanica na primjenu lijekova u kontroliranoj stimulaciji jajnika (Morón i Ruiz, 2010; Desai i sur., 2013). Farmakogenetika je znanstvena disciplina koja proučava ulogu varijacija DNA u

odgovoru neke osobe na uzimanje lijeka, te pokušava pronaći mogućnost primjene znanja o sekvenci DNA bolesnika u poboljšanju terapije. Od trenutno poznatih genskih biljega značajnih za medicinski potpomognutu oplodnju, pokazalo se da su *SNP* polimorfizmi gena *FSHR*, uključujući i varijante *Asn680Ser*, potencijalni predstavnici biljega za predviđanje ishoda odgovora pacijentice na terapiju kontrolirane hormonske stimulacije jajnika (Desai i suradnici, 2013).

Rezultati studija, koje su promatrale povezanost bazalne razine FSH između osoba s različitim Asn680Ser genotipskim varijantama, proturječni su. Dio autora (Perez Mayorga i sur., 2000; Falconer i sur., 2005; Jun i sur., 2006; Yao i sur., 2011; Desai i sur., 2013; Huang i sur., 2014) opisuje međuovisnost Ser/Ser genotipa i bazalne razine FSH, na način da pacijentice sa Ser/Ser genotipom imaju povećanu razinu FSH, što za posljedicu ima potrebu za većom količinom egzogenog gonadotropina tijekom stimulacije jajnika. Navedene studije upućuju kako je Ser/Ser genotip relativno neosjetljiv na stimulaciju egzogenim FSH. Loutardis i suradnici (2006), uočili su statistički značajnu međuovisnost između gonadotropinske doze i bazalne razine FSH unutar pripadnika Asn/Asn genotipske varijante. Za razliku od gore navedenih literaturnih podataka koji, iako proturječni, ukazuju na međuovisnost pojedinih genotipskih varijanti s bazalnim razinama FSH i/ili primijenjenoj gonadotropinskoj dozi, druge skupine autora navode nedostatak povezanosti (Sheikhha i sur., 2011; Mohiyiddeen i sur., 2012; Mohiyiddeen i sur., 2013; Kuijper i sur. 2011).

Naši rezultati također ukazuju da nije prisutna međuovisnost pojedinih genotipskih varijanti s bazalnom razinom FSH, kao ni s primijenjenom gonadotropinskom dozom.
Gledano prema razini egzogenog rFSH potrebnog za hormonsku stimulaciju i odgovoru na hormonsku stimulaciju, mjerenom brojem dobivenih jajnih stanica, sve su ispitanice pokazivale statistički značajnu negativnu korelaciju, ali bez razlike obzirom na pojedinu genotipsku varijantu.

Iako nismo uočili međuovisnost pojedinih genotipskih varijanti i bFSH, utjecaj genotipske varijante i bFSH, promatran u odnosu na odgovor na hormonsku stimulaciju mjeren brojem dobivenih jajnih stanica, pokazao je za skupinu ispitanica sa Ser/Ser varijantom značajnu negativnu međuovisnost u odnosu na ostale dvije skupine ispitanica. Drugim riječima, u skupini Ser/Ser jače je bila izražena povezanost razine bFSH i broja dobivenih jajnih stanica. Također, u skupini Ser/Ser jače je izražena i povezanost broja jajnih stanica s bazalnom

razinom LH, omjerom bFSH/bLH, te bazalnom razinom estradiola i progesterona. Pretpostavljamo jedno od slijedećeg: ili je receptor kodiran Ser alelom na određeni način osjetljiviji, ili je broj receptora veći, ili su u ispitanica (koje su nosioci ovog alela) prisutne i druge posebnosti koje utječu na njihovu specifičnu fiziološku endokrinološku sliku. Daelemans i suradnici (2004), kao i Achrekar i suradnici (2009), opisali su veću učestalost Ser/Ser genotipa kod pacijentica sa sindromom hiperstimulacije jajnika, što je u suprotnosti s mišljenjem da je Ser alel manje aktivan. Altmae i suradnici (2011) u svom preglednom članku, u kojem analiziraju rezultate 43 studije o polimorfizmu gena *FSHR*, navode kako je važno raditi korekcije rezultata za dob, te da je to možda razlog zašto se u literaturi nailazi na proturječne podatke.

Daljnjim pregledom literature o povezanosti različitih genotipskih varijanti i pokazatelja odgovora na hormonsku stimulaciju jajnika koji uključuju vrijednosti AFC, vršne vrijednosti estradiola i broj dobivenih jajnih stanica, također je proturječna. Dio autora navodi da ispitanice sa Ser/Ser u odnosu na ispitanice s Asn/Asn ili Asn/Ser genotipskom varijantom, iskazuju veće vrijednosti za izmjereni AFC, vršne razine estradiola i broj dobivenih jajnih stanica (Daelemans i sur., 2004; Greb i sur., 2005; Loutradis i sur., 2006; Achrekar i sur., 2009; Boudjenah i sur., 2012). Drugi autori navode da nema međuovisnosti između AFC i gentotipskih varijanti gena *FSHR* (Genro i sur., 2012), uz studije koje navode manji broj dobivenih jajnih stanica kod ispitanica sa Ser/Ser nasuprot Asn/Asn ili Asn/Ser genotipskom varijantom (Jun i sur., 2006; Lledo i sur., 2013; Yan i sur.. 2013; Huang i sur. 2014).
Gledano prema pojedinim genotipskim varijantama, naši rezultati ne pokazuju razlike u vrijednostima razine AFC, vršne vrijednosti estradiola, broju vodećih folikula, broju dobivenih jajnih stanica i debljini endometrija. Međutim, kada smo uz genotipske varijante uključili i odgovor na hormonsku stimulaciju mjeren brojem jajnih stanica, parametri AFC i debljina endometrija pokazali su pozitivnu statističku značajnost za sve genotipske varijante. Vrijednosti AFC već prije su se pokazale kao koristan pokazatelj odgovora jajnika i kvalitete stimulacijskog protokola u metodama medicinski potpomognute oplodnje (Chang i sur., 1998; Broekmans i sur., 2010; Hsu i sur., 2011; Styer i Toth, 2011; Rosen, 2011).

Iako gledano prema pojedinim genotipskim varijantama naši rezultati ne pokazuju razlike u vršnoj vrijednosti estradiola, oni pokazuju statistički značajnu pozitivnu međuovisnost s brojem dobivenih jajnih stanica, neovisno o genotipskoj varijanti. Isto tako je i broj prenesenih zametaka u statistički značajnoj pozitivnoj međuovisnosti s brojem dobivenih

jajnih stanica, neovisno o genotipskoj varijanti ispitanica. Navedeni rezultati u skladu su s opažanjima prethodnih studija koje također ukazuju kako povećana vršna razina estradiola rezultira većim brojem jajnih stanica i zametaka, dostupnih za selekciju ili za prijenos ili za kriopohranu (Chenette i sur., 1990; Ng, 2000; Kably i sur., 2000; Peña i sur., 2002; Papageorgiou i sur., 2002; Bianco i sur., 2009; Kyrou i sur., 2009). Sukladno našim rezultatima, vezano uz izostanak statističke značajnosti, gledano po pojedinoj genotipskoj varijanti ispitanica, i druge grupe autora navode da parametri, kao što su vršna vrijednost estradiola na dan davanja hCG, broj folikula, broj dobivenih jajnih stanica i stopa kliničkih trudnoća, ne pokazuju statistički značajnu razliku među ispitanicama s različitim genotipskim varijantama, te upućuju da genotipske varijante *FSHR* gena nemaju utjecaj na ishod postupka medicinski potpomognute oplodnje (Laven i sur., 2003; de Castro i sur., 2004; Genro i sur., 2012; Mohiyiddeen i sur., 2012; Mohiyiddeen i sur., 2013).

Ukratko, naši dobiveni rezultati, vezano uz odgovor jajnika izražen brojem dobivenih jajnih stanica, pokazuju po skupinama:

- Asn/Asn: statistički značajnu negativnu međuovisnost za dob, te statistički značajnu pozitivnu međuovisnost za bazalnu razinu prolaktina i estradiola.
- Ser/Ser: statistički značajnu negativnu međuovisnost između bazalne razine FSH, LH te njihovog omjera, uz pozitivnu statistički značajnu međuovisnost između bazalne razine estradiola i progesterona.

Skupina ispitanica s varijantom Asn/Ser je pokazala najmanje statistički značajne međuovisnosti između mjerenih parametara, osim u slučaju dobi, gdje je bila prisutna statistički značajna negativna međuovisnost. Iz prethodno navedenog, razvidno je da homozigotne varijante pokazuju veće specifičnosti u odgovoru na hormonsku stimulaciju jajnika u odnosu na heterozigotnu varijantu.

Istraživanja koja opisuju povezanost jačine odgovora na stimulaciju jajnika (uredan odgovor *versus* slab odgovor), s prisutnošću pojedine genotipske varijante, navode njihovu zastupljenost unutar obje skupine ispitanica, gdje ispitanice s urednim odgovorom pokazuju statistički značajnu sklonost da nose Asn/Ser genotipsku varijantu (Loutradis i sur., 2006). Među našim ispitanicama, pokazalo se da ne postoji statistički značajna razlika u raspodjeli tri genotipske varijante među ispitanicama podijeljenih prema odgovoru na hormonsku stimulaciju jajnika (uredan *versus* slab odgovor). Međutim, Spearmanova korelacijska analiza otkriva statistički značajnu povezanost vrijednosti bazalnog estradiola s brojem dobivenih jajnih stanica u ukupnoj populaciji ispitanica, te posebno među Asn/Asn, još izraženije među Ser/Ser genotipom. Nadalje, uočeno je da ispitanice koje su svrstane u skupinu s urednim

odgovorom na hormonsku stimulaciju jajnika, pokazuju značajno nižu vrijednost bazalne razine FSH, uz statistički značajno više vrijednosti AFC, broja vodećih folikula, vršne vrijednosti estradiola, debljine endometrija te zahtijevaju niže doze egzogenog rFSH i imaju kraći period stimulacije, uz veći postotak postupaka s pozitivnim ishodom, u usporedbi s parametrima ispitanica koje smo svrstali u skupinu sa slabim odgovorom na hormonsku stimulaciju jajnika, što je u skladu s literaturnim podacima (Broekmans i sur., 2014).

Promatrani parametar BMI, kod naših ispitanica, pokazao je statistički značajno višu vrijednost u skupini ispitanica s genotipskom varijantom Ser/Ser naspram druge dvije skupine. Autori Anagnostou i suradnici (2013) zaključili su da nema razlike u raspodjeli *Asn680Ser FSHR* genotipskih varijanti između pretilih ispitanica (koje nisu imale sindrom policističnih jajnika) i ispitanica manje tjelesne težine. Prema našem saznanju, naši rezultati prvi ukazuju na statistički značajnu povezanost parametra BMI i Ser/Ser *FSHR* polimorfizma. Dodatno, u našem radu uočili smo statistički značajno više koncentracije prolaktina kod skupine ispitanica s BMI $\geq$ 25. Već je otprije poznato da povećani BMI može dovesti do promjena metabolizma i regulacije lučenja hormona (Santoro i sur., 2004).

Međutim, u našem radu nismo uočili da promatrana međuovisnost genotipske varijante Ser/Ser i BMI, u odnosu na odgovor na hormonsku stimulaciju jajnika, pokazuje statističku značajnost. Također, nije bila prisutna niti statistička značajnost međuovisnost BMI s parametrima odgovora na hormonsku stimulaciju jajnika, neovisno o genotipskoj varijanti ispitanica. Neki autori povezuju povećani BMI s lošim ishodima postupaka izvantjelesne oplodnje, kako kod pretilih tako i kod gojaznih žena (Lenoble i sur., 2008; Rittenberg i sur. 2011). Neke studije ukazuju da žene s povećanim BMI brže odgovaraju na stimulaciju uz prisutan veći broj folikula, te zahtijevaju manje doze gonadotropina, ali bez statistički značajnog utjecaja na ishod IVF postupka (Frattarelli i sur., 2004; Hill i sur. 2011). Nasuprot tome, u drugim studijama je pretilost povezana sa smanjenim odgovorom na stimulaciju jajnika i potrebom za većim dozama gonadotropina te pretile pacijentice pokazuju statistički značajno smanjen broj folikula i manji broj dobivenih jajnih stanica (Matalliotakis i sur., 2008; Li i sur., 2010). Razvidno je iz gore navedenog, da ne postoji suglasje vezano uz utjecaj BMI na odgovor jajnika na hormonsku stimulaciju.

Fekunditet žena smanjuje se s porastom životne dobi, popraćeno postepenim padom kvantitete i kvalitete jajnih stanica, što značajno utječe na mogući ishod IVF postupka (Broekmans i sur., 2009; Kimberly i sur., 2012). Uspoređujući parametre odgovora na hormonsku stimulaciju s dobi ispitanica, prateći skupine razvrstane po starosti do 32 godine, od 32 do 36 godina, te iznad 36 godina, uočili smo da se parametri ne mijenjaju naglo već

postepeno. Ispitanice koje su imale manje od 36 godina (najmlađa i srednja dobna skupina), pokazivale su i zadržale tendenciju primati manje količine egzogenog rFSH potrebnog za hormonsku stimulaciju jajnika, uz više vršne koncentracije estradiola i broja dobivenih jajnih stanica u odnosu na najstariju skupinu ispitanica, što je u skladu s literaturnim podacima (Santoro i sur., 1996; Barad i sur., 2007; Zhen i sur., 2008; Alviggi i sur., 2009; Sills i sur., 2009). Zanimljivo je da su se kao dobno najosjetljiviji parametri pokazali razina AFC, vrijeme stimulacije i debljina endometrija, na način da su razina AFC i debljine endometrija značajno viši, a vrijeme stimulacije značajno kraće kod najmlađe skupine ispitanica (do 32 godine), u odnosu na najstariju dobnu skupinu (iznad 36 godina). Tako možemo pretpostaviti da su vrijednosti AFC, duljine trajanja stimulacije i debljine endometrija najraniji pokazatelji opadanja fekunditeta kod žena. Statistički značajna pozitivna međuovisnost razine AFC i broja dobivenih jajnih stanica, te statistički značajna negativna međuovisnost razine AFC i starosti ispitanica, prethodno su opisane (Ben-Haroush i sur., 2012; Silva i sur., 2014; Broekmans i sur., 2014; Shaban i Abdel Moety, 2014; Vural i sur., 2014; La Marca i sur., 2014). Razina AFC smanjuje se tijekom starenja, a ukazuje na potencijalnu količinu jajnih stanica koje je moguće dobiti, što se može povezati s vjerojatnošću uspjeha postupka IVF (Chang i sur., 1998; Broekmans i sur. 2004). Skupina gena koja je potencijalno povezana s razinama AFC i drugim biljezima rezerve jajnika te reproduktivnog vijeka već je otprije opisana u literaturi (Schuh-Huerta i sur., 2012; Morón i Ruiz, 2010).

Iz navedenog proizlazi da albanska populacija ispitanica ima svoju etničku posebnost u raspodjeli homozigotnih genotipskih varijanti gena *FSHR*. Nadalje, rezultati ovog rada daju nova saznanja o poveznicama genotipskih varijanti i bazalnih razina hormona, koji u osi hipofiza – jajnik imaju ulogu pokretanja dozrijevanja folikula. Primjena dobivenih rezultata bila bi korisna za poboljšani dizajn protokola hormonske stimulacije jajnika, kako bi se udovoljilo individualnim potrebama pacijenata u skladu s njihovim genetskim naslijeđem, te time doprinijelo optimizaciji farmakološkog tretmana (doziranja egzogenih gonadotropina), kako bi rješavanje problema neplodnosti, pomoću postupaka medicinski potpomognute oplodnje, završilo uspješnim ishodom. Uzevši sve navedeno u obzir, važno je napomenuti da u literaturi postoji velika raznolikost u opisanim rezultatima obzirom na *Asn680Ser FSHR* polimorfizma, kao genetskog biljega, za predviđanje odgovora na hormonsku stimulaciju jajnika odnosno ishoda postupaka medicinski potpomognute oplodnje. Stoga rezultate koji su proizašli iz ovog rada treba dodatno potvrditi na većem broju uzoraka, kako bi došli do sveobuhvatnih podataka za albansku populaciju žena.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti slijedeće:

- Unutar ispitivane populacije albanskih žena Dukjagin regije Republike Kosovo zabilježena je veća učestalost Ser/Ser genotipa u odnosu na Asn/Asn genotip, po čemu se ispitivana populacija razlikuje od do sada objavljenih podataka za druge etničke skupine.
- U ovom je radu po prvi put utvrđena statistički značajna povezanost BMI i Ser/Ser genotipske varijante gena *FSHR* u cjelokupnoj populaciji ispitanica, što zavrjeđuje proširenje istraživanja na veći broj uzoraka, kako bi se utvrdilo je li riječ o slučajnom ishodu uzorkovanja ili činjenici vezanoj uz etnicitet.
- Dobiveni rezultati ukazuju na činjenicu da su pojedine genotipske varijante polimorfizma *Asn680Ser* specifično povezane s bazalnom razinom hormona. Drugim riječima, genotipska varijanta ima odraz u fiziološko/endokrinološkoj varijanti.
- Navedeni rezultati ukazuju da, iako pojedine genotipske varijante polimorfizma *Asn680Ser FSHR* nemaju izravan utjecaj na ishod postupka medicinski potpomognute oplodnje, mogu pripomoći u odabiru primjerenog lijeka i doze za postizanje optimalne kontrolirane hormonske stimulacije jajnika.
- U ovom radu također je potvrđena vrijednost određivanja razine AFC, debljine endometrija, te duljina trajanja stimulacije, kao ranih pokazatelja fiziološkog starenja jajnika.

7. LITERATURA

1. Achermann JC, Meeks JJ, Jameson JL. Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF-1. Mol Cell Endocrinol 2001; 185(1-2):17-25.

2. Achrekar SK, Modi DN, Desai SK, Mangoli VS, Mangoli RV, Mahale SD. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (Thr307Ala) is associated with variable ovarian response and ovarian hyperstimulation syndrome in Indian women. Fertil Steril 2009; 91(2):432-9.

3. Achrekar SK, Modi DN, Desai SK, Mangoli VS, Mangoli RV, Mahale SD. Poor ovarian response to gonadotrophin stimulation is associated with FSH receptor polymorphism. Reprod Biomed Online 2009; 18(4):509-15.

4. Achrekar SK, Modi DN, Meherji PK, Patel ZM, Mahale SD. Follicle stimulating hormone receptor gene variants in women with primary and secondary amenorrhea. J Assist Reprod Genet 2010; 27:317–326.

5. Aittomaki K, Dieguez Lucena J, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila E, Lehva¨slaiho H, Engel A. et al Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. Cell 1995; 82:959–968.

6. Aittomäki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehväslaiho H, Engel AR, Nieschlag E, Huhtaniemi I, de la Chapelle A. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. Cell 1995; 82:959.

7. Akhondi MM, Binaafar S, Ardakani ZB, Kamali K, Kosari H, Ghorbani B. Aspects of psychosocial development in infertile versus fertile men. J Reprod Infertil 2013; 14(2):90-3.

8. Allen L, Achermann J, Pakarinen P, Kotlar T, Huhtaniemi I, Jameson J. A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergondotrophic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. Hum Reprod 2003; 18:251–256.

9. Allen VM, Wilson RD, Cheung A. Genetics Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada (SOGC); Reproductive Endocrinology Infertility Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada (SOGC). Pregnancy outcomes after assisted reproductive technology. J Obstet Gynaecol Can 2006; 28(3):220-50.

10. Altmäe S, Hovatta O, Stavreus-Evers A, Salumets A. Genetic predictors of controlled ovarian hyperstimulation: where do we stand today? Hum Reprod Update. 2011; 17:813–28.

11. Alviggi C, Humaidan P, Howles CM, Tredway D, Hillier SG. Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology. Reprod Biol Endocrinol 2009; 7:101.

12. Anagnostou E, Drakakis, P, Marinopoulos S, Mavrogianni D, Loutradis D. The impact of genetics profile (gene polymorphisms) in obese non-PCOS women entering an IVF/ICSI program. Curr Drug Targets 2013; 14:850-855.

13. Anderson RA, Nelson SM, Wallace WH. Measuring anti-Müllerian hormone for the assessment of ovarian reserve: when and for whom is it indicated? Maturitas. 2012; 71(1):28-33.

14. Australian Government National Health and Medical Research Council. Ethical guidelines on the use of assisted reproductive technology in clinical practice and research 2007. Available at: http://www.nhmrc.gov.au/guidelines/publications/e78. Accessed on February 25, 2013.

15. Bachelot A, Binart N. Reproductive role of prolactin. Reproduction 2007; 133(2):361-9.

16. Bachir BG, Jarvi K. Infectious, inflammatory, and immunologic conditions resulting in male infertility. Urol Clin North Am 2014; 41(1):67-81.

17. Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1963; 158:417–33.

18. Barad DH, Weghofer A, Gleicher N. Age-specific levels for basal follicle-stimulating hormone assessment of ovarian function. Obstet Gynecol 2007; 109:1404-10.

19. Barazani Y, Katz BF, Nagler HM, Stember DS. Lifestyle, environment, and male reproductive health. Urol Clin North Am 2014; 41(1):55-66.

20. Aittomaki K, Dieguez Lucena J, Pakarinen P, Beau I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A, Matuchansky C. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. J Clin Investig 1998; 102:1352–59.

21. Behre H, Greb R, Mempel A, Sonntag B, Kiesel L, Kaltwasser P. Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: a pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation. Pharmacogenet Genomics 2005; 15:451–6.

22. Ben-Haroush A, Farhi J, Zahalka Y, Sapir O, Meizner I, Fisch B. Correlations between antral follicle count and ultrasonographic ovarian parameters and clinical variables and outcomes in IVF cycles. Gynecol Endocrinol 2012; 28:432-5.

23. Bernichtein S, Touraine P, Goffin V. New concepts in prolactin biology. J Endocrinol. 2010; 206(1):1-11.

24. Beshay VE, Carr BR. Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis and Control of the Menstrual Cycle. In: Falcone T and Hurd WW, eds., Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide. Springer Science Business Media, New York, 2013

25. Bianco K, Mahutte NG, Arici A, Sakkas D, Taylor, HS. Effect of estradiol on oocyte development. Int J Gynaecol Obstet. 2009; 104:230-232.

26. Binder H, Dittrich R, Hager I, Müller A, Oeser S, Beckmann MW, Hamori M, Fasching PA, Strick R. Association of FSH receptor and CYP19A1 gene variations with sterility and ovarian hyperstimulation syndrome. Reproduction 2008; 135(1):107-16.

27. Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Jenkins J, Pellicer A. Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: Analysis of over 4000 cycles. Hum Reprod 2010; 25:2092–100.

28. Bosch E, Valencia I, Escudero E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Premature luteinization during gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles and its relationship with in vitro fertilization outcome. Fertil Steril 2003; 80:1444–9.

29. Boudjenah R, Molina-Gomes D, Torre A, Bergere M, Bailly M, Boitrelle F, Taieb S, Wainer R, Benahmed M, de Mazancourt P, Selva J, Vialard F. Genetic polymorphisms influence the ovarian response to rFSH stimulation in patients undergoing in vitro fertilization programs with ICSI. PLoS One 2012; 7(6):38700.

30. Britt KL, Findlay JK. Estrogen actions in the ovary revisited. J Endocrinol 2002; 175(2):269-76.

31. Broekmans FJ, de Ziegler D, Howles CM, Gougeon A, Trew G, Olivennes F. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. Fertil Steril 2010; 94:1044-51.

32. Broekmans FJ, Faddy MJ, Scheffer G, te Velde ER. Antral follicle counts are related to age at natural fertility loss and age at menopause. Menopause 2004; 11:607-14.

33. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. Endocrine Rev 2009; 30:465-93.

34. Broekmans FJ, Verweij PJ, Eijkemans MJ, Mannaerts BM, Witjes H. Prognostic models for high and low ovarian responses in controlled ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol. Hum Reprod 2014; 29:1688-97.

35. Burns KH, Matzuk MM. Minireview: genetic models for the study of gonadotropin actions. Endocrinology 2002; 143(8):2823-35.

36. Casas-González P, Scaglia HE, Pérez-Solís MA, Durand G, Scaglia J, Zariñán T, Dias JA, Reiter E, Ulloa-Aguirre A. Normal testicular function without detectable follicle-stimulating hormone. A novel mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene leading to apparent constitutive activity and impaired agonist-induced desensitization and internalization. Mol Cell Endocrinol 2012; 364:71–82.

37. Chang MY, Chiang CH, Chiu TH, Hsieh TT, Soong YK. The antral follicle count predicts the outcome of pregnancy in a controlled ovarian hyperstimulation/intrauterine insemination program. J Assist Reprod Genet 1998; 15:12-7.

38. Chantot-Bastaraud S, Ravel C, Siffroi JP. Underlying karyotype abnormalities in IVF/ICSI patients. Reprod Biomed Online 2008; 16(4):514-22.

39. Chenette PE, Sauer MV, Paulson RJ. Very high serum estradiol levels are not detrimental to clinical outcome of in vitro fertilization. Fertil Steril 1990; 54:858-63.

40. Cheung AP, Sierra S, AlAsiri S, Carranza-Mamane B, Case A, Dwyer C, Graham J, Havelock J, Hemmings R, Lee F, Liu K, Murdock W, Senikas V, Vause TD, Wong BC. Reproductive Endocrinology and Infertility Committee; Family Physicians Advisory Committee; Maternal-Fetal Medicine Committee; Executive and Council of the Society of Obstetricians, Liu K, Case A. Advanced reproductive age and fertility. J Obstet Gynaecol Can 2011; 33(11):1165-75.

41. Christensen A, Bentley GE, Cabrera R, Ortega HH, Perfito N, Wu TJ, Micevych P. Hormonal regulation of female reproduction. Horm Metab Res 2012; 44(8):587-91.

42. Christensen RB, Matsumoto AM, Bremmer WJ. Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism with anosmia (Kallmann syndrome). Endocrinologist 1992; 2:332.

43. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gourmelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougnères P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. Nature 1998; 392:98.

44. Colicchia M, Campagnolo L, Baldini E, Ulisse S, Valensise H, Moretti C. Molecular basis of thyrotropin and thyroid hormone action during implantation and early development. Hum Reprod Update 2014; 20(6):884-904.

45. Cramer DW, Sluss PM, Powers RD, McShane P, Ginsburgs ES, Hornstein MD, Vitonis AF, Barbieri RL. Serum prolactin and TSH in an in vitro population: is there a link between fertilization and thyroid function? J Assist Reprod Genet 2003; 20:210–15.

46. Daar A, Merali Z. Infertility and social suffering: the case of ART in developing countries. In: Vayena E, Rowe P, Griffin D, eds., Report of a meeting on Medical, Ethical, and Social Aspects of Assisted Reproduction; 2001 17-21 Sept; Geneva, Switzerland: WHO; 20021. p. 16-21.

47. Daelemans C, Smits G, de Maertelaer V, Costagliola S, Englert Y, Vassart G, Delbaere A. Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:6310-15.

48. Davis D, Liu X, Segaloff D. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function. Mol Endocrinol 1995; 9:159–70.

49. de Castro F, Morón FJ, Montoro L, Galán JJ, Hernández DP, Padilla ES, Ramírez-Lorca R, Real LM, Ruiz A. Human controlled ovarian hyperstimulation outcome is a polygenic trait. Pharmacogenetics 2004; 14(5):285-93.

50. De Leener A, Montanelli L, Van Durme J, Chae H, Smits G, Vassart G, Costagliola S. Presence and absence of follicle-stimulating hormone receptor mutations provide some insights into spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome physiopathology. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(2):555-62.

51. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:10972.

52. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, Milgrom E. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. N Engl J Med 1997; 337:1597.

53. Desai SS, Achrekar SK, Pathak BR, Desai SK, Mangoli VS, Mangoli RV, Mahale SD. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (G-29A) is associated with altered level of receptor expression in Granulosa cells. J Clin Endocrinol Metab 2011; 96(9):2805-12.

54. Desai SS, Roy BS, Mahale SD. Mutations and polymorphisms in FSH receptor: functional implications in human reproduction. Reproduction 2013; 146(6):R235-48.

55. Devi YS, Halperin J. Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. Mol Cell Endocrinol 2014; 382(1):400-10.

56. Di Renzo GC, Giardina I, Clerici G, Mattei A, Alajmi AH, Gerli S. The role of progesterone in maternal and fetal medicine. Gynecol Endocrinol. 2012; 28(11):925-32.

57. Dodé C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Dû N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F, Pêcheux C, Le Tessier D, Cruaud C, Delpech M, Speleman F, Vermeulen S, Amalfitano A, Bachelot Y, Bouchard P, Cabrol S, Carel JC, Delemarre-van de Waal H, Goulet-Salmon B, Kottler ML, Richard O, Sanchez-Franco F, Saura R, Young J, Petit C, Hardelin JP. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. Nat Genet 2003; 33:463.

58. Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S. A novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. J Clin Endocrinol Metabol 2002; 87:1151–5.

59. Drummond AE, Fuller PJ. Ovarian actions of estrogen receptor-β: an update. Semin Reprod Med 2012; 30(1):32-8.

60. Dunson DB, Baird DD, Colombo B. Increased infertility with age in men and women. Am J Obstet Gynecol 2004; 103:51–56.

61. Erickson GF1, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. Fertil Steril 2001; 76(5):943-9.

62. European Society of Human Reproduction and Embryology. Comparative analysis of medically assisted reproduction in the EU: regulation and technologies (SANCO/2008/C6/051). Final report. 2008. Available at: http://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Legislation-for- MAR-treatments.aspx.

63. Desai N, Ludgin J, Sharma R, Anirudh RK, Agarwal A. Female and Male Gametogenesis in Falcone T, Hurd WW. (eds.), *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide*, 43 DOI 10.1007/978-1-4614-6837-0_3, © Springer Science+Business Media New York 2013

64. Falconer H, Andersson E, Aanesen A, Fried G. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in a population of infertile women. Acta Obstet Gyn Scan 2005; 84:806-11.

65. Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. Nature 2005; 433:269–77.

66. Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: Physiological concepts and clinical consequences. Endocr Rev 1997; 18:71–106.

67. Ferlin A, Foresta C. New genetic markers for male infertility. Curr Opin Obstet Gynecol 2014; 26(3):193-8.

68. Fidler A, Bernstein J. Infertility: from a personal to a public health problem. Public Health Rep 1999; 114:494-511.

69. Filicori M, Cognigni GE, Pocognoli P, Tabarelli C, Spettoli D, Taraborrelli S, Ciampaglia W. Modulation of folliculogenesis and steroidogenesis in women by graded menotrophin administration. Hum Reprod 2002; 17:2009–15.

70. Frattarelli JL, Kodama CL. Impact of body mass index on in vitro fertilization outcomes. J Assist Reprod Genet 2004; 21:211-5.

71. Fujimoto T, Miyayama Y, Fuyuta M. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. Anat Rec 1977; 188(3):315–30.

72. Gallego A, Rogel R, Luján S, Plaza B, Delgado F, Boronat F. AZF gene microdeletions: Case series and literature review. Actas Urol Esp 2014; 38(10):698-702.

73. Gelbaya TA, Potdar N1, Jeve YB, Nardo LG. Definition and epidemiology of unexplained infertility. Obstet Gynecol Surv 2014; 69(2):109-15.

74. Genro VK, Matte U, De Conto E, Cunha-Filho JS, Fanchin R. Frequent polymorphisms of FSH receptor do not influence antral follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone administration as assessed by the Follicular Output RaTe (FORT). J Assist Reprod Genet 2012; 29:657-63.

75. Gerasimova T, Thanasoula MN, Zattas D, Seli E, Sakkas D, Lalioti MD. Identification and in vitro characterization of follicle stimulating hormone (FSH) receptor variants associated with abnormal ovarian response to FSH. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95(2):529-36.

76. Gokalp O. Prolactin and Infertility. In: Nagy GM and Toth BE, eds., Prolactin. ISBN 978-953-51-0943-3, Published: under CC BY 3.0 license. 2013.

77. Gondos B, Bhiraleus P, Hobel CJ. Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries. Am J Obstet Gynecol 1971; 110(5):644–52.

78. Gondos B, Westergaard L, Byskov AG. Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. Am J Obstet Gynecol 1986; 155(1):189–95.

79. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocr Rev 1996; 17(2):121–55.

80. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: A model from preliminary results. Hum Reprod 1986; 1(2):81-7.

81. Greb RR, Grieshaber K, Gromoll J, Sonntag B, Nieschlag E, Kiesel L, Simoni M. A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(8):4866-72.

82. Gromoll J, Dankbar B, Gudermann T. Characterization of the 5′ flanking region of the human follicle-stimulating hormone receptor gene. Mol Cell Endocrinol 1994; 102:93–102.

83. Gromoll J, Pekel E, Nieschlag E. The structure and organization of the human follicle-stimulating hormone receptor gene. Genomics 1996; 35:308–311.

84. Gromoll J, Schulz A, Borta H, Gudermann T, Teerds KJ, Greschniok A, Nieschlag E, Seif FJ. Homozygous mutation within the conserved Ala-Phe-Asn-Glu-Thr motif of exon 7 of the LH receptor causes male pseudohermaphroditism. Eur J Endocrinol 2002; 147:597–608.

85. Grynnerup AG, Lindhard A, Sørensen S. Recent progress in the utility of anti-Müllerian hormone in female infertility. Curr Opin Obstet Gynecol 2014; 26(3):162-7.

86. Grynnerup AG, Lindhard A, Sørensen S. The role of anti-Müllerian hormone in female fertility and infertility - an overview. Acta Obstet Gynecol Scand 2012; 91(11):1252-60.

87. Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. Hum Reprod 2008; 23(3):699–708.

88. Hardy K, Wright CS, Franks S, Winston RM. In vitro maturation of oocytes. Br Med Bull 2000; 56(3):588–602.

89. Hill MJ, Levy G, Levens ED. Does exogenous LH in ovarian stimulation improve assisted reproduction success. An appraisal of the literature? Reprod Biomed Online 2012; 24:261–71.

90. Hill MJ, Hong S, Frattarelli JL. Body mass index impacts in vitro fertilization stimulation. ISRN Obstet Gynecol 2011; 2011:929251.

91. Hotaling JM. Genetics of male infertility. Urol Clin North Am 2014; 41(1):1-17.

92. Howe G, Westhoff C, Vessey M, Yeates D. Effects of age, cigarette smoking, and other factors on fertility: findings in a large prospective study. BMJ 1985; 290:1697–700.

93. Hsu A, Arny M, Knee AB, Bell C, Cook E, Novak AL, Grow DR. Antral follicle count in clinical practice: analyzing clinical relevance. Fertil Steril 2011; 95:474-479.

94. Huang X, Li L, Hong L, Zhou W, Shi H, Zhang H, Zhang Z, Sun X, Du J. The Ser680Asn polymorphism in the follicle-stimulating hormone receptor gene is associated with the ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation. Clin Endocrinol (Oxf), 2014; doi: 10.1111/cen.12573. [Epub ahead of print]

95. Jiang X, Liu H, Chen X, Chen PH, Fischer D, Sriraman V, Yu HN, Arkinstall S, He X. Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor. PNAS 2012; 109:12491–96.

96. Jones RL, Hannan NJ, Kaitu'u TJ, Zhang J, Salamonsen LA. Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:6155-67.

97. Jun JK, Yoon JS, Ku SY, Choi YM, Hwang KR, Park SY, Lee GH, Lee WD, Kim SH, Kim JG, Moon SY. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET. J Hum Genet 2006; 51:665-70.

98. Kably Ambe A, Barrón Vallejo J, Tapia Lizárraga RC, Krivitsky SK. Effect of blood concentrations of preovulatory estradiol on the quality of eggs and pre-embryos in patients treated with fertilization in vitro. Ginecol Obstet Mex 2000; 68:435-41.

99. Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. Endocrinology 1997; 138:1224–31.

100. Kamel RM. Assisted reproductive technology after the birth of Louise Brown. J Reprod Infertil 2013; 14(3):96-109.

101. Keramat A, Masoomi SZ, Mousavi SA, Poorolajal J, Shobeiri F, Hazavhei SM. Quality of life and its related factors in infertile couples. J Res Health Sci 2014; 14(1):57-63.

102. Kimberly L, Case A, Cheung AP, Sierra S, AlAsiri S, Carranza-Mamane B, Case A, Dwyer C, Graham J, Havelock J, Hemmings R, Lee F, Liu K, Murdock W, Senikas V, Vause TD, Wong BC. Advanced reproductive age and fertility. Int J Gynaecol Obstet 2012; 117:95-102.

103. Klinkert ER, te Velde ER, Weima S, van Zandvoort PM, Hanssen RG, Nilsson PR, de Jong FH, Looman CW, Broekmans FJ. FSH receptor genotype is associated with pregnancy but not with ovarian response in IVF. Reprod Biomed Online 2006; 13(5):687-95.

104. Kolibianakis EM, Papanikolaou EG, Fatemi HM, Devroey P. Estrogen and folliculogenesis: is one necessary for the other? Curr Opin Obstet Gynecol 2005; 17(3):249-53.

105. Krassas GE, Poppe K, Glinoer D. Thyroid function and human reproductive health. Endocr Rev 2010; 31(5):702-755.

106. Kuechler A, Hauffa BP, Ko¨ninger A, Kleinau G, Albrecht B, Horsthemke B, Gromoll J. An unbalanced translocation unmasks a recessive mutation in the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene and causes FSH resistance. Eur J Human Genet 2010; 18:656–61.

107. Kuijper EA, Blankenstein MA, Luttikhof LJ, Roek SJ, Overbeek A, Hompes PG, Twisk JW, Lambalk CB. Frequency distribution of polymorphisms in the FSH receptor gene in infertility patients of different ethnicity. Reprod Biomed Online 2011; 22(1):60-5

108. Kyrou D, Popovic-Todorovic B, Fatemi HM, Bourgain C, Haentjens P, Van Landuyt L, Devroey P. Does the estradiol level on the day of human chorionic gonadotrophin administration have an impact on pregnancy rates in patients treated with rec-FSH/GnRH antagonist? Hum Reprod 2009; 24:2902- 9.

109. Lalioti MD. Impact of follicle stimulating hormone receptor variants in fertility. Curr Opin Obstet Gynecol. 201123(3):158-67.

110. La Marca A, Volpe A. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? Clin Endocrinol (Oxf) 2006; 64(6):603-10.

111. La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. Hum Reprod Update 2014; 20:124-40.

112. Laven JS, Mulders AG, Suryandari DA, Gromoll J, Nieschlag E, Fauser BC, Simoni M. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in women with normogonadotropic anovulatory infertility. Fertil Steril 2003; 80:986-92.

113. Layman LC, Cohen DP, Jin M, Xie J, Li Z, Reindollar RH, Bolbolan S, Bick DP, Sherins RR, Duck LW, Musgrove LC, Sellers JC, Neill JD. Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. Nat Genet 1998; 18:14.

114. Layman LC. The genetic basis of female reproductive disorders: etiology and clinical testing. Mol Cell Endocrinol 2013; 370(1-2):138-48.

115. Lenoble C, Guibert J, Lefebvre G, Dommergues M. Effect of women's weight on the success rate of in vitro fertilization. Gynecol Obstet Ferti 2008; 36:940-4.

116. Li Y, Yang D, Zhang Q. Impact of overweight and underweight on IVF treatment in Chinese women. Gynecol Endocrinol 2010; 26:416-22.

117. Lledo B, Guerrero J, Turienzo A, Ortiz JA. Morales R, Ten J, Llacer J, Bernabeu R. Effect of follicle-stimulating hormone receptor N680S polymorphism on the efficacy of follicle-stimulating hormone stimulation on donor ovarian response. Pharmacogenet Genom 2013; 23:262-8.

118. Londra L, Wallach E, Zhao Y. Assisted reproduction: Ethical and legal issues. Semin Fetal Neonatal Med 2014; 19(5):264-71.

119. Longcope C, Abend S, Braverman LE, Emerson CH. Androstenedione and estrone dynamics in hypothyroid women. J Clin Endocrinol Metab 1990; 70:903–7.

120. Loumaye E, Engrand P, Shoham Z, Hillier SG, Baird DT. Clinical evidence for an LH 'ceiling' effect induced by administration of recombinant human LH during the late follicular phase of stimulated cycles in World Health Organization type I and type II anovulation. Hum Reprod 2003; 18:314–22.

121. Loutradis D, Patsoula E, Minas V, Koussidis GA, Antsaklis A, Michalas S, Makrigiannakis A. FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs. J Assist Reprod Genet 2006; 23(4):177-84.

122. Luk BH, Loke AY. The Impact of Infertility on the Psychological Well-Being. Marital Relationships, Sexual Relationships, and Quality of Life of Couples: A Systematic Review. J Sex Marital Ther 2014; 11:1-16.

123. Madan K. Balanced complex chromosome rearrangements: reproductive aspects. Am J Med Genet A 2012; 158A(4):947-63.

124. Mahutte NG, Ouhilal S. Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis and Control of the Menstrual Cycle In: Hurd WW and Falcone T, eds., Clinical reproductive medicine and surgery. St. Louis, MO: Mosby/Elsevier; 2007

125. Marsh CA, Hecker E. Maternal obesity and adverse reproductive outcomes: reducing the risk. Obstet Gynecol Surv 2014; 69(10):622-8.

126. 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; 16:778-83.

127. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev 2000; 21(2):200–14.

128. Meduri G, Touraine P, Beau I, Lahuna O, Desroches A, Vacher-Lavenu C. Delayed puberty and primary amenorrhea associated with a novel mutation of the human follicle-stimulating hormone receptor: clinical, histological, and molecular studies. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:3491–98.

129. Mohiyiddeen L, Newman WG, McBurney H, Mulugeta B, Roberts SA, Nardo LG. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphisms are not associated with ovarian reserve markers. Fertil Steril 2012; 97(3):677-81.

130. Mohiyiddeen L, Newman WG, Cerra C, McBurney H, Mulugeta B, Roberts SA, Nardo, L.G. A common Asn680Ser polymorphism in the follicle-stimulating hormone receptor gene is not associated with ovarian response to gonadotropin stimulation in patients undergoing in vitro fertilization. Fertil Steril 2013; 99:149-55.

131. Monga M, Alexandrescu B, Katz SE, Stein M, Ganiats T. Impact of infertility on quality of life, marital adjustment, and sexual function. Urology 2004; 63(1):126-30.

132. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature 1997; 387:903.

133. Montanelli L, Van Durme JJ, Smits G, Bonomi M, Rodien P, Devor EJ, Moffat-Wilson K, Pardo L, Vassart G, Costagliola S. Modulation of ligand selectivity associated with activation of the transmembrane region of the human follitropin receptor. Mol Endocrinol 2004; 18(8):2061-73.

134. Montgomery GW, Zondervan KT, Nyholt DR. The future for genetic studies in reproduction. Mol Hum Reprod 2014; 20(1):1-14.

135. Morón FJ, Ruiz A. Pharmacogenetics of controlled ovarian hyperstimulation: time to corroborate the clinical utility of FSH receptor genetic markers. Pharmacogenomics 2010; 11:1613-18.

136. Mueller S, Jaeschke H, Günther R, Paschke R. The hinge region: an important receptor component for GPHR function. Trends Endocrinol Metab 2010; 21(2):111-22.

137. Nakamura Y, Maekawa R, Yamagata Y, Tamura I, Sugino N. A novel mutation in exon 8 of the follicle-stimulating hormone receptor in a women with primary amenorrhea. Gynecol Endocrinol 2008; 24:708–12.

138. New York State Department of Health Task Force on Life and Law. Executive summary of assisted reproductive technologies: analysis and recommendations for public policy. 2011. Available at: http://www.health.ny.gov/regulations/task_force/reports_publications/ execsum.htm. Accessed on February 25, 2013.

139. Ng EH. What is the threshold value for serum estradiol levels associated with adverse IVF outcomes? Fertil Steril 2000; 73:1071-2.

140. O'Dea L, O'Brien F, Currie K, Hemsey G. Follicular development induced by recombinant luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) in anovulatory women with LH and FSH deficiency: Evidence of a threshold effect. Curr Med Res Opin 2008; 24:2785–93.

141. Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. Ann N Y Acad Sci 2008; 1127:1-9.

142. Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. Hum Reprod 2010; 25(12):2944-54.

143. Orio F Jr, Ferrarini E, Cascella T, Dimida A, Palomba S, Gianetti E, Colao A, Agretti P, Vitti P, Lombardi G, Pinchera A, Tonacchera M. Genetic analysis of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with polycystic ovary syndrome. J Endocrinol Inv 2006; 29:975–82.

144. Ozlü T, Güngör AC, Dönmez ME, Duran B. Use of progestogens in pregnant and infertile patients. Arch Gynecol Obstet 2012; 286(2):495-503.

145. Palermo R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. Reprod Biomed Online 2007; 15:326–37.

146. Papageorgiou T, Guibert J, Goffinet F, Patrat C, Fulla Y, Janssens Y, Zorn JR. Percentile curves of serum estradiol levels during controlled ovarian stimulation in 905 cycles stimulated with recombinant FSH show that high estradiol is not detrimental to IVF outcome. Hum Reprod 2002, 17:2846-50.

147. Papavasiliou SS, Zmeili S, Khoury S, Landefeld TD, Chin WW, Marshall JC. Gonadotropin-releasing hormone differentially regulates expression of the genes for luteinizing hormone alpha and beta subunits in male rats. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:4026–29.

148. Pastuszak AW, Lamb DJ. The genetics of male fertility--from basic science to clinical evaluation. J Androl 2012; 33(6):1075-84.

149. Peña JE, Chang PL, Chan LK, Zeitoun K, Thornton MH 2nd, Sauer MV. Supraphysiological estradiol levels do not affect oocyte and embryo quality in oocyte donation cycles. Hum Reprod 2002; 17:83-7.

150. Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85(9):3365-9.

151. Pfeifer S, Goldberg J, Lobo R, Thomas M, Widra E, Licht M, Collins J, Cedars M, Vernon M, Davis O, Gracia C, Catherino W, Thornton K, Rebar R, La Barbera A. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 2008; 90(5):60.

152. Phillip M, Arbelle JE, Segev Y, Parvari R. Male hypogonadism due to a mutation in the gene for the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. N Engl J Med 1998; 338:1729.

153. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. Ann Rev Biochem 1981; 50:465–95.

154. Poppe K, Velkeniers B, Glinoer D. Thyroid disease and female reproduction. Clin Endocrinol (Oxf) 2007; 66:309-21.

155. Rajcan-Separovic E. Chromosome microarrays in human reproduction. Hum Reprod Update 2012; 18(5):555-67.

156. Raju GA, Chavan R, Deenadayal M, Gunasheela D, Gutgutia R, Haripriya G, Govindarajan M, Patel NH, Patki AS. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. J Hum Reprod Sci 2013; 6(4):227-34.

157. Raju GA, Chavan R, Deenadayal M, Gunasheela D, Gutgutia R, Haripriya G, Govindarajan M, Patel NH, Patki AS. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. J Hum Reprod Sci 2013; 6(4):227-34.

158. Reproductive Endocrinology and Infertility Committee; Family Physicians Advisory Committee; Maternal-Fetal Medicine Committee; Executive and Council of the Society of Obstetricians, Liu, K. and Case, A. Advanced reproductive age and fertility. J Obstet Gynaecol Can 2011; 33:1165-75.

159. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. J Clin Invest 2010; 120(4):963-72.

160. Rittenberg V, Seshadri S, Sunkara SK, Sobaleva S, Oteng-Ntim E, El-Toukhy T. Effect of body mass index on IVF treatment outcome: an updated systematic review and meta-analysis. Reprod BioMed Online 2011; 23:421-39.

161. Rosen MP. Do oocyte quality and quantity as measured by antral follicle count decline in parallel? Fertil Steril 2011; 95:482-3.

162. Sánchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. Biochim Biophys Acta 2012; 1822(12):1896-912.

163. Sánchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. Biochim Biophys Acta 20121822(12):1896-912.

164. Santoro N, Brown J, Adel T, Skurnick JH. Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81:1495-501.

165. Santoro N, Lasley B, McConnell D, Allsworth J, Crawford S, Gold EB, Finkelstein JS, Greendale GA, Kelsey J, Korenman S, Luborsky JL, Matthews K, Midgley R, Powell L, Sabatine J, Schocken M, Sowers MF, Weiss G. Body size and ethnicity are associated with menstrual cycle alterations in women in the early menopausal transition:

The Study of Women's Health across the Nation (SWAN) Daily Hormone Study. J Clin Endocrinol Metabol 2004; 89:2622-31.

166. Scanlon MF, Chan V, Heath M, Pourmand M, Rodriguez-Arnao MD, Weightman DR, Lewis, M, Hall R. Dopaminergic control of thyrotropin, alpha-subunit, thyrotropin beta-subunit, and prolactin in euthyroidism and hypothyroidism: dissociated responses to dopamine receptor blockade with metoclopramide in hypothyroid subjects. J Clin Endocrinol Metabol 1981; 53:360–5.

167. Schuh-Huerta SM, Johnson NA, Rosen MP, Sternfeld B, Cedar MI, Reijo Pera RA. Genetic markers of ovarian follicle number and menopause in women of multiple ethnicities. Hum Genet 2012; 131:1709-24.

168. Schwartz CE, Dean J, Howard-Peebles PN, Bugge M, Mikkelsen M, Tommerup N, Hull C, Hagerman R, Holden JJ, Stevenson RE. Obstetrical and gynecological complications in fragile X carriers: a multicenter study. Am J Med Genet 1994; 51:400.

169. Seeburg PH, Mason AJ, Stewart TA, Nikolics K. The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. Recent Prog Horm Res 1987; 43:69–98.

170. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 2003; 349:1614.

171. Shaban MM, Abdel Moety GA. Role of ultrasonographic markers of ovarian reserve in prediction of IVF and ICSI outcome. Gynecol Endocrinol 2014; 30:290-3.

172. Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. Reproduction 2003; 126(1):13-25.

173. Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. Reprod Biol Endocrinol 2013; 11:66.

174. Sheikhha MH, Eftekhar M, Kalantar SM. Investigating the association between polymorphism of follicle-stimulating hormone receptor gene and ovarian response in

controlled ovarian hyperstimulation. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009; 146(1):30-6.

175. Sills ES, Alper MM, Walsh AP. Ovarian reserve screening in infertility: practical applications and theoretical directions for research. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009; 146(1):30-6.

176. da Silva GM, Diniz AL, Bernardino Neto M, Marcolini TT, Perillo LC, Pires Wde P, Pessoa SM. Number of antral follicles and the success of in vitro fertilization: a multivariate analysis. Rev Bras Ginecol Obstet. 2014; 36(10):473-9.

177. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. Endocr Rev 1997; 18:739–73.

178. Simoni M, Casarini L. Mechanisms in endocrinology: Genetics of FSH action: a 2014-and-beyond view. Eur J Endocrinol 2014; 170(3):91-107.

179. Skorupskaite K, George JT, Anderson RA. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. Hum Reprod Update 2014; 20(4):485-500.

180. Smits G, Olatunbosun O, Delbaere A, Pierson R, Vassart G. Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor. N Engl J Med 2003; 349:760–6.

181. Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada, Okun N, Sierra S, Douglas WR, Audibert F, Campagnolo C, Carroll J, Cartier L, Chitayat D, Gagnon A, Langlois S, Murphy-Kaulbeck L, MacDonald WK, Pastuck M, Tan LY, Poplak V, Robson H. Pregnancy outcomes after assisted human reproduction. J Obstet Gynaecol Can 2014; 36(1):64-83.

182. Styer AK, Toth TL. Antral follicle count in clinical practice: building the bridge from ovarian reserve to in vitro fertilization outcome. Fertil Steril 2011; 95:480-1.

183. Sudo S, Kudo M, Wada S, Sato O, Hsueh AJ, Fujimoto S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. Mol Hum Reprod 2002; 8(10):893-9.

184. Sullivan MW, Stewart-Akers A, Krasnow JS, Berga SL, Zeleznik AJ. Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): A role for LH in the final stages of follicular maturation. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:228–232.

185. Sunkara SK, Coomarasamy A, Khalaf Y, Braude P. A three-arm randomised controlled trial comparing Gonadotrophin Releasing Hormone (GnRH) agonist long regimen versus GnRH agonist short regimen versus GnRH antagonist regimen in women with a history of poor ovarian response undergoing in vitro fertilisation (IVF) treatment: Poor responders intervention trial (PRINT). Reprod Health 2007; 4:12.

186. Talaulikar VS, Arulkumaran S. Reproductive outcomes after assisted conception. Obstet Gynecol Surv 2012; 67:566–83.

187. Tapanainen J, Aittoma¨ki K, Min J, Vaskivuo T, Huhtaniemi I. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. Nat Genet 1997; 15:205–6.

188. Thomas R, Reid RL. Thyroid disease and reproductive dysfunction: a review. Obstet Gynecol 1987; 70:789–98.

189. Toledo SP, Brunner HG, Kraaij R, Post M, Dahia PL, Hayashida CY, Kremer H Themmen AP. An inactivating mutation of the luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46,XX female. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81:3850.

190. Touraine P, Beau I, Gougeon A, Meduri G, Desroches A, Pichard C. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. Mol Endocrinol 1999; 13:1844–54.

191. Vale W, Rivier C, Brown M. Regulatory peptides of the hypothalamus. Ann Rev Physiol 1977; 39:473–527.

192. van Balen F, Inhorn M. Interpreting infertility: a view from the social sciences. In: Inhorn M and van Balen F, eds., Infertility around the globe: new thinking on childlessness, gender, and reproductive technologies. London: University of California Press; 2002. p. 3-32.

193. Vasseur C, Rodien P, Beau , Desroches A, Gérard C, de Poncheville L, Chaplot S, Savagner F, Croué A, Mathieu E, Lahlou N, Descamps P, Misrahi M. A chorionic gonadotropin-sensitive mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial gestational spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. N Engl J Med 2003; 349(8):753-9.

194. Vayena E, Rowe P. Peterson H. Assisted reproductive technology in developing countries: why should we care? Fertil Steril 2002; 78(1):13-5.

195. Voutilainen R, Tapanainen J, Chung BC, Matteson KJ, Miller WL. Hormonal regulation of P450scc (20,22-desmolase) and P450c17 (17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human granulosa cells. J Clin Endocrinol Metab 1986; 63:202–7.

196. Vural B, Cakiroglu Y, Vural F, Filiz S. Hormonal and functional biomarkers in ovarian response. Arch Gynecol Obstet 2014; 289(6):1355-61.

197. Weiss RV, Clapauch R. Female infertility of endocrine origin. Arq Bras Endocrinol Metabol 2014; 58(2):144-52.

198. Wetendorf M, DeMayo FJ. Progesterone receptor signaling in the initiation of pregnancy and preservation of a healthy uterus. Int J Dev Biol 2014; 58(2-4):95-106.

199. Wetendorf M, DeMayo FJ. The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. Mol Cell Endocrinol. 2012; 357(1-2):108-18.

200. Witschi E. Migration of the germ cells of human embryo from the yolk sac to the primitive gonadal folds. Contrib Embryol Carnegie Inst 1948; 32:69–80.

201. Wunsch A, Ahda Y, Banaz-Yaşar F, Sonntag B, Nieschlag E, Simoni M, Gromoll J. Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region influence the expression of the human follicle-stimulating hormone receptor. Fertil Steril 2005; 84(2):446-53.

202. Yan Y, Gong Z, Zhang L, Li Y, Li X, Zhu L, Sun L. Association of follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms with ovarian response in Chinese women: a prospective clinical study. PLoS One 2013; 8(10):78138.

203. Yao Y, Ma CH, Tang HL, Hu YF. Influence of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) Ser680Asn polymorphism on ovarian function and in-vitro fertilization outcome: a meta-analysis. Mol Genet Metab 2011; 103(4):388-93.

204. Zeleznik AJ. The physiology of follicle selection. Reprod Biol Endocrinol 2004; 2:31.

205. Zhen XM, Qiao J, Li R, Wang LN, Liu P. The clinical analysis of poor ovarian response in in-vitro-fertilization embryo-transfer among Chinese couples. J Assist Reprod Genet 2008; 25(1):17-22.

8. Popis kratica i simbola

ACTH adrenokortikotropni hormon (*eng. adrenocorticotropic hormone*)

AIH inseminacija sjemenom partnera (*eng. artificial insemination by husband/variation human*)

Ala alanin

Arg arginin

AMH anti-Mullerian hormon

ART pomognuta oplodnja (*eng. assisted reproductive technology, ART*)

Asn aspargin

bFSH bazalna koncentracija FSH

bLH bazalna koncentracija LH

BMI indeks tjelesne mase (*eng. body mass indeks*)

COS kontrolirana stimulacija janika (*eng. controlled ovarian stimulation*)

CRH hormon koji oslobađa kortikotropin (*eng. corticotropin releasing hormone*)

dNTP deoksinukleotid-trifosfat

E2 estradiol

FSH folikul stimulirajući hormon

FSHR receptor za FSH

GH hormon rasta (*eng. growth hormone*)

GHRH hormon koji oslobađa hormon rasta (*eng. growth hormone releasing hormone*)

GnRH hormon koji oslobađa gonadotropine (*eng. gonadotrophin releasing hormone*)

hCG humani korionski gonadotropin (*eng. human chorionic gonadotropin*)

ICSI intracitoplazmatsko injiciranje spermija (*eng. intracytoplasmic sperm injection*)

IVF izvantjelesna oplodne (*eng. in vitro fertilisation*)

kDa	kilodalton
LH	luteinizirajući hormon
PRL	prolaktin
Pro	prolin
rFSH	rekombinantni FSH
Ser	serin
Thr	treonin (eng. threonine)
THR	hormon koji otpušta tireotropin (*eng. thyreotropin releasing hormone*)
TSH	hormon koji stimulira tireoideu (*eng. thyroid stimulating hormone*)

9. **Curiculum Vitae**

ZAFER GASHI

01.11.1966

Rr.ABEDIN REXHA P.N, 32000 KLINE , REPUBLIKA KOSOVO

Email;biolabzafi@hotmail.com, tel. 0037744139015

OBRAZOVANJE

Poslijediplomski doktorski studij 2009-2014. Sveučilište u Zagrebu, PMF, poslijediplomski doktorski studij prirodnih znanosti, znanstveno polje biologija, smjer molekularna biologija.

Poslijediplomski studij 2010-2012. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, poslijediplomski specijalistički studij, Medicinska biokemija i laboratorijska medicina.

Poslijediplomski studij 2006-2009. Univerzitet u Prištini, PMF, poslijediplomski magistarski studij prirodnih znanosti, polje biologija, smjer molekularna biologija.

Dodiplomski studij 2003-2005. Zdravstveno veleučilište u Zagrebu, dodiplomski studij, smjer medicinsko-laboratorijska dijagnostika.

Dodiplomski studij 1988 -1991. Visoka zdravstvena škola u Zagrebu, dodiplomski studij, smjer ing. medicinske laboratorije.

Srednja škola 1982-1986. Srednja medicinska škola u Prizrenu, Kosovo, srednja medicinska škola, smjer laboratorijski tehničar.

PUBLIKACIJE

1. **Zafer Gashi**, Shkelzen Elezaj, Afrim Zeqiraj, Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda, Ismet Dervishaj, Syle Nikqi, Fitore Gashi. Polymorphisms of the FSH receptor and pregnancy rates in women of different ages in the oocyte donation program. MEDICUS, 2014 (Acceptance for publication).

2. Afrim Zeqiraj, **Zafer Gashi**. Creatine Kinase Activity in Human Seminal Fluid. IJISET - International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology, Vol. 1 Issue 3, May 2014; 220-226.

3. Selim Kolgeci1, Jehona Kolgeci, Mehmedali Azemi, Ruke Shala-Beqiraj, **Zafer Gashi**, Mentor Sopjani. Cytogenetic Study in Children with Down Syndrome Among Kosova Albanian Population Between 2000 and 2010. Mat Soc Med. 2013 Jun 25(2): 131-135.

4. **Zafer Gashi**, Afrim Zeqiraj, Shkelzen Elezaj, Selim Kolgeci, Albert Lila. CREATINE KINASE ACTIVITY IN HUMAN SEMINAL FLUID. Medicus 2013, Vol. 18 (2): 25-31.

5. **Zafer Gashi**, Shkelzen Elezaj, Afrim Zeqiraj , Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda, Albert Rexhaj, Ramush Mahmutaj, Causes of infertility in men residing in the Dukagjini region in Kosovo, A.A.O.G, Janar 2013, Vol./V/ Nr.13. 102-103.

SUDJELOVANJE NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

1. DEGREE; course of progressing V-ultrasound in obstretik -gjinikologji, ;;IAN DONALD;; schools. The VII Congres of Prenatal Medicine in Tirana .14-16, March 2014.

2. Certificate. For participance in III-th Congres of Kosvova-Albanian ENT-Head and Neck Surgery. 25-26 May 2013. Gjakovo.

3. Certificate. Of attendence in the international symposium mild stimulation in IVF/IVM, Gjakova, 11 May 2013.

4. Certificate. Attended pre congres course IUI for 5 hours. 10 th MSRM Congres, Budva, Montenegro. 10.05.2012.

5. Certificate.For participance in Symposium. Bladder cancer. Kosova Association of Urology.Prishtina .06-07 June 2011.

6. Certificate of attendance of ,,THE SPERMOGRAM COURSE,, of ;;The 4 symposium of IVF in Kosova;;24 Aprill 2010, Gjakova.

7. Certificate of attendance in First meeting of the Croatian Association for Cancer Research with international participation. November 11, 2010.Zagreb,Croatia.

8. Certificate of attendance of ;;The 3 rd symposium of IVF in Kosova;; 25 Aprill 2009, Gjakova.

USMENA PRIOPĆENJA

Zafer Gashi, Shkelzen Elezaj, Afrim Zeqiraj, Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda. Standardization of the laboratory analysis of sperm in Kosvovo: Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of the parameters of sperm.The 2rd Congres of Obstetric and Gynecology in Kosovo. Prishtina, 19-20 September 2014.

Zafer Gashi, Shkelzen Elezaj, Afrim Zeqiraj, Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda, Ismet Dervishaj. Comperativ study of intrauterine insemination (IUI) and fallopian tube sperm perfusion (FSP), one –year experience of the Special Hospital for Gynicology,Infertility,and Endocrinology.INFERTYLITI CENTER, Peja , Kosovo. The VII Congres of Prenatal Medicine in Tirana, .14-16, March 2014.

Zafer Gashi, Shkelzen Elezaj, Albert Lila, Afrim Zeqiraj. Creatine Kinase Activity in Human Seminal Fluid. The 1st Congres of Obstetric and Gynecology in Kosovo. Pec, 18- 19, May 2012.

Zafer G., Afrim Z, Shkelzen E., Ibrahim F. Rezultati aplikacije intratubarne inseminacije u Poliklinici ,,Biolab-Zafi,,. Mediterranean Symposium in Reproductive Medicine. 2010. Budva, Crna Gora.

POSTERSKA PROPĆENJA

1.Afrim Zeqiraj, **Zafer Gashi**, Shkelzen Elezaj, Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda, Ismet Dervishaj.The vlue of Progesteron on day of the menstrual cycle and the day of issuance of

HCG (12D) as an indicator of pregnancy during IVF/ICSI Procedure. The VII Congres of Prenatal Medicine in Tirana, .14-16, March 2014.

2**.Zafer Gashi**, Shkelzen Elezaj, Afrim Zeqiraj, Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda, Albert Lila. FSH receptor genes polymorphismis in Albanian women. The 3rd Congres of Obstetric and Gynecology. Tirana, April 26-28, 2013.

3**.Zafer G**, Bujar G, Afrim Z, Ibrahim F. Prevalence of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealiticum in women of reproductive age in the region of the Dukagjini plain (Kosovo). 5th Croatioan Congres of Microbiology with International Participation Primosten, Croatia, 26-30 September, 2012.

4.Tomislav Vladušić, Reno Hrašćan, Nives Pećina-Šlaus, Božo Krušlin, Ivana Vrhovac, Verica Garaj-Vrhovac, **Zafer Gashi**, Jasmina Frankić. Alterations of selected genes in testicular germ cell tumors: can they predict clinical outcome?, The 3rd Congres of Croatian Geneticists, Krk, 13-16 svibnja 2012.

5.**Zafer Gashi**, Shkelzen Elezaj, Afrim Zeqiraj, Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda, Albert Lila. Causes of infertility in men residing in the Dukagjini region in Kosovo.Attended Congres for 13 hours as delegate with Poster presentation. Budva, Montenegro, 12.05.2012.

6**.Zafer G**., Ibrahim F. Rezultati medicinske pomognute oplodnje u Poliklinici „Biolab-Zafi“ u Kosovu. Prvi kongres o medicinskoj oplodnji. 14-15 svibnja 2010. Plitvicka jezera, Hrvatska.

RADNO ISKUSTVO

2009 – do danas : Voditelj embriološkog laboratorija za umjetnu oplodnju u specijalnoj bolnici za IVF, Grad Peja, Republika Kosovo

200-2009 : Voditelj Laboratorija za biokemiju i hematologiju u poliklinici Biolab-Zafi,, Klina, Republika Kosovo.

8. ŽIVOTOPIS

ZAFER GASHI
01.11.1966
Rr.ABEDIN REXHA P.N, 32000 KLINE , REPUBLIKA KOSOVO
Email;biolabzafi@hotmail.com, tel. 0037744139015

OBRAZOVANJE

Poslijediplomski doktorski studij 2009-2014. Sveučilište u Zagrebu, PMF, poslijediplomski doktorski studij prirodnih znanosti, znanstveno polje biologija, smjer molekularna biologija.

Poslijediplomski studij 2010-2012. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, poslijediplomski specijalistički studij, Medicinska biokemija i laboratorijska medicina.

Poslijediplomski studij 2006-2009. Univerzitet u Prištini, PMF, poslijediplomski magistarski studij prirodnih znanosti, polje biologija, smjer molekularna biologija.

Dodiplomski studij 2003-2005. Zdravstveno veleučilište u Zagrebu, dodiplomski studij, smjer medicinsko-laboratorijska dijagnostika.

Dodiplomski studij 1988 -1991. Visoka zdravstvena škola u Zagrebu, dodiplomski studij, smjer ing. medicinske laboratorije.

Srednja škola 1982-1986. Srednja medicinska škola u Prizrenu, Kosovo, srednja medicinska škola, smjer laboratorijski tehničar.

PUBLIKACIJE

1. **Zafer Gashi**, Shkelzen Elezaj, Afrim Zeqiraj, Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda, Ismet Dervishaj, Syle Nikqi, Fitore Gashi. Polymorphisms of the FSH receptor and pregnancy rates in women of different ages in the oocyte donation program. MEDICUS, 2014 (Acceptance for publication).

2. Afrim Zeqiraj, **Zafer Gashi**. Creatine Kinase Activity in Human Seminal Fluid. IJISET - International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology, Vol. 1 Issue 3, May 2014; 220-226.

3. Selim Kolgeci1, Jehona Kolgeci, Mehmedali Azemi, Ruke Shala-Beqiraj, **Zafer Gashi**, Mentor Sopjani. Cytogenetic Study in Children with Down Syndrome Among Kosova Albanian Population Between 2000 and 2010. Mat Soc Med. 2013 Jun 25(2): 131-135.

4. **Zafer Gashi**, Afrim Zeqiraj, Shkelzen Elezaj, Selim Kolgeci, Albert Lila. CREATINE KINASE ACTIVITY IN HUMAN SEMINAL FLUID. Medicus 2013, Vol. 18 (2): 25-31.

5. **Zafer Gashi**, Shkelzen Elezaj, Afrim Zeqiraj , Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda, Albert Rexhaj, Ramush Mahmutaj, Causes of infertility in men residing in the Dukagjini region in Kosovo, A.A.O.G, Janar 2013, Vol./V/ Nr.13. 102-103.

SUDJELOVANJE NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

1. DEGREE; course of progressing V-ultrasound in obstretik -gjinikologji, ;;IAN DONALD;; schools. The VII Congres of Prenatal Medicine in Tirana .14-16, March 2014.

2. Certificate. For participance in III-th Congres of Kosvova-Albanian ENT-Head and Neck Surgery. 25-26 May 2013. Gjakovo.

3. Certificate. Of attendence in the international symposium mild stimulation in IVF/IVM, Gjakova, 11 May 2013.

4. Certificate. Attended pre congres course IUI for 5 hours. 10 th MSRM Congres, Budva, Montenegro. 10.05.2012.

5. Certificate.For participance in Symposium. Bladder cancer. Kosova Association of Urology.Prishtina .06-07 June 2011.

6. Certificate of attendance of ,,THE SPERMOGRAM COURSE,, of ;;The 4 symposium of IVF in Kosova;;24 Aprill 2010, Gjakova.

7. Certificate of attendance in First meeting of the Croatian Association for Cancer Research with international participation. November 11, 2010.Zagreb,Croatia.

8. Certificate of attendance of ;;The 3 rd symposium of IVF in Kosova;; 25 Aprill 2009, Gjakova.

USMENA PRIOPĆENJA

Zafer Gashi, Shkelzen Elezaj, Afrim Zeqiraj, Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda. Standardization of the laboratory analysis of sperm in Kosvovo: Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of the parameters of sperm.The 2rd Congres of Obstetric and Gynecology in Kosovo. Prishtina, 19-20 September 2014.

Zafer Gashi, Shkelzen Elezaj, Afrim Zeqiraj, Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda, Ismet Dervishaj. Comperativ study of intrauterine insemination (IUI) and fallopian tube sperm perfusion (FSP), one –year experience of the Special Hospital for Gynicology,Infertility,and Endocrinology.INFERTYLITI CENTER, Peja , Kosovo. The VII Congres of Prenatal Medicine in Tirana, .14-16, March 2014.

Zafer Gashi, Shkelzen Elezaj, Albert Lila, Afrim Zeqiraj. Creatine Kinase Activity in Human Seminal Fluid. The 1st Congres of Obstetric and Gynecology in Kosovo. Pec, 18- 19, May 2012.

Zafer G., Afrim Z, Shkelzen E., Ibrahim F. Rezultati aplikacije intratubarne inseminacije u Poliklinici „Biolab-Zafi,,. Mediterranean Symposium in Reproductive Medicine. 2010. Budva, Crna Gora.

POSTERSKA PROPĆENJA

1.Afrim Zeqiraj, **Zafer Gashi**, Shkelzen Elezaj, Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda, Ismet Dervishaj.The vlue of Progesteron on day of the menstrual cycle and the day of issuance of

HCG (12D) as an indicator of pregnancy during IVF/ICSI Procedure. The VII Congres of Prenatal Medicine in Tirana, .14-16, March 2014.

2**.Zafer Gashi**, Shkelzen Elezaj, Afrim Zeqiraj, Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda, Albert Lila. FSH receptor genes polymorphismis in Albanian women. The 3rd Congres of Obstetric and Gynecology. Tirana, April 26-28, 2013.

3**.Zafer G**, Bujar G, Afrim Z, Ibrahim F. Prevalence of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealiticum in women of reproductive age in the region of the Dukagjini plain (Kosovo). 5th Croatioan Congres of Microbiology with International Participation Primosten, Croatia, 26-30 September, 2012.

4.Tomislav Vladušić, Reno Hrašćan, Nives Pećina-Šlaus, Božo Krušlin, Ivana Vrhovac, Verica Garaj-Vrhovac, **Zafer Gashi**, Jasmina Frankić. Alterations of selected genes in testicular germ cell tumors: can they predict clinical outcome?, The 3rd Congres of Croatian Geneticists, Krk, 13-16 svibnja 2012.

5.**Zafer Gashi**, Shkelzen Elezaj, Afrim Zeqiraj, Ibrahim Fazliu, Bujar Gruda, Albert Lila. Causes of infertility in men residing in the Dukagjini region in Kosovo.Attended Congres for 13 hours as delegate with Poster presentation. Budva, Montenegro, 12.05.2012.

6**.Zafer G**., Ibrahim F. Rezultati medicinske pomognute oplodnje u Poliklinici „Biolab-Zafi“ u Kosovu. Prvi kongres o medicinskoj oplodnji. 14-15 svibnja 2010. Plitvicka jezera, Hrvatska.

RADNO ISKUSTVO

2009 – do danas : Voditelj embriološkog laboratorija za umjetnu oplodnju u specijalnoj bolnici za IVF, Grad Peja, Republika Kosovo

200-2009 : Voditelj Laboratorija za biokemiju i hematologiju u poliklinici Biolab-Zafi,, Klina, Republika Kosovo.