

Utjecaj uvjeta kulture in vitro na metabolizam optimalnih zametaka

Gelo, Nina

Doctoral thesis / Disertacija

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:429713>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Nina Gelo

**UTJECAJ UVJETA KULTURE *IN VITRO* NA
METABOLIZAM OPTIMALNIH ZAMETAKA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Nina Gelo

**UTJECAJ UVJETA KULTURE *IN VITRO* NA
METABOLIZAM OPTIMALNIH ZAMETAKA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Nina Gelo

**EFFECT OF *IN VITRO* EMBRYO
CULTIVATION CONDITIONS ON OPTIMAL
EMBRYOS METABOLISM**

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2019.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničkoga bolničkog centra u Zagrebu, pod vodstvom dr.sc. Patrika Stanića u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Dr. sc. Patrik Stanić, dipl. inž. biologije voditelj je Laboratorija za medicinski pomognutu oplodnju u Poliklinici Repromed.

Rođen je 1969. godine u Pragu, Republika Češka. Osnovnu i srednju školu završava u Zagrebu, a 1994. godine diplomira na studiju Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2006. završava Poslijediplomski znanstveni doktorski studij u području Biomedicine i zdravstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Od 1996. do 2016. godine radi na poslovima mlađeg do višeg asistenta na Katedri za ginekologiju i opstetriciju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te kao klinički embriolog i voditelj Odjela za kliničku embriologiju u Zavodu za humanu reprodukciju Klinike za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

S doktorom Radončićem surađuje dugi niz godina na poslovima medicinski pomognute oplodnje u Poliklinici Vili u Zagrebu i Poliklinici Škvorc u Samoboru.

Stručno se usavršavao u brojnim IVF laboratorijima i vodećim IVF klinikama u svijetu, među ostalima u McGill Univerzitetskoj bolnici u Montrealu, Univerzitetskoj bolnici Zürich, Univerzitetskoj bolnici Antwerpen kao i na brojnim tečajevima o embriologiji, andrologiji i kriobiologiji u organizaciji Europskog udruženje za humanu reprodukciju i embriologiju.

Sudjeluje u izvođenju teorijske nastave i seminara u dodiplomskim i poslijediplomskim studijima na Medicinskom fakultetu i Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Mentor je studentima pri izradi diplomskih radova i doktorskih disertacija, a surađuje na znanstvenim projektima kao istraživač u području reprodukcije medicine. Pozvani je predavač na brojnim međunarodnim i domaćim stručnim kongresima. Autor je brojnih članaka i kongresnih priopćenja te nekoliko poglavlja u knjigama iz područja humane reprodukcije.

Član je Europskog udruženje za humanu reprodukciju i embriologiju (ESHRE), gdje je od 2012. do 2017. godine izabrani predstavnik embriologa za Republiku Hrvatsku. Posjeduje licencu senior kliničkog embriologa izdanu od strane ESHRE. Član je Hrvatskog društva kliničkih embriologa (HDKE) od osnutka, a potpredsjednik društva od 2013 godine.

Zahvaljujem se svojem mentoru dr. sc. Patriku Staniću na velikom trudu i požrtvovnosti koja je bila potrebna da se provede ovo istraživanje. Hvala na strpljenju i pomoći u svim fazama izrade ovog rada.

Zahvaljujem se dragim kolegicama kliničkim embriologinjama Gabrieli Kirinec i Višnji Hlavati te laboratorijskim tehničarkama Suzani Orlić i Ljiljani Dobec na velikom trudu, podršci i pomoći oko laboratorijskog dijela istraživanja.

Zahvaljujem se kolegicama dr.sc. Mariji Zekušić i Ani Škaričić na pomoći oko analize aminokiselina.

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Hrvoju Vrčiću na poticaju i potpori pri izradi ovog rada. Zahvaljujem se prof.dr.sc. Davoru Ježeku na potpori pri izradi ovog rada.

Veliko hvala doc. dr. sc. Milanu Miloševiću za pomoć pri statističkoj obradi podataka.

Najveće hvala mojoj obitelji na potpori i razumijevanju tijekom izrade ovog rada.

UTJECAJ UVJETA KULTURE *IN VITRO* NA METABOLIZAM OPTIMALNIH HUMANIH ZAMETAKA

NINA GELO

Klinika za ženske bolesti i porode, Petrova 13

U ovom istraživanju pokušali smo utvrditi koji uvjeti kulture *in vitro* (kultivacija sa 5% ili 20% O₂) pogoduju razvoju optimalnih zametaka te kakav je njihov utjecaj na metabolizam zametaka. Dosadašnju metodu utvrđivanja optimalnih zametaka, odnosno njihove kvalitete (procjenu morfologije) potrebno je dopuniti objektivnom, neinvazivnom metodom koja ne podliježe subjektivnom sudu biologa, odnosno embriologa. Takva potencijalna metoda je utvrđivanje metaboličkih profila aminokiselina zametaka testiranjem potrošenog medija u kojem smo ih kultivirali. Razdvajanje i analiza aminokiselina provedeni su kromatografijom obrnutih faza na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti masa spregnute s tandemskom spektrometrijom, a zametke smo kultivirali sa različitim udjelima kisika – sa 5% ili 20%. Dobiveni rezultati su nam pokazali da snižena koncentracija kisika (5%) povećava biološki potencijal optimalnih zametaka za implantaciju odnosno za ostvarivanje trudnoće. Također smo utvrdili da kultivacija zametaka sa povišenom koncentracijom kisika (20%) utječe na metabolizam zametaka lošije kvalitete kod kojih uzrokuje povećan obrtaj aminokiselina.

(83 stranice/ 26 slika/ 18 tablica/ 79 literaturnih navoda/ jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: blastocista, morfologija zametaka, metabolizam aminokiselina, *in vitro* fertilizacija, embriotransfer

Mentor: dr.sc. Patrik Stanić

Ocjenjivači:

prof.dr.sc. Marina Šprem Goldštajn, izv.prof. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

prof.dr.sc. Vesna Benković, red.prof. PMF Sveučilišta u Zagrebu

prof.dr.sc. Domagoj Đikić, red.prof. PMF Sveučilišta u Zagrebu

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

**EFFECT OF *IN VITRO* EMBRYO CULTIVATION CONDITIONS ON OPTIMAL
EMBRYOS METABOLISM**

NINA GELO

Department of Gynaecology and Obstetrics, Petrova 13

In our research we tried to determine which *in vitro* culture conditions (cultivation under 5% or 20% O₂) can yield optimal embryos and their effect on embryo metabolism. Current method for determining optimal embryos (morphology assessment) should be supplemented by an objective, non-invasive. method that is not subject to the subjective judgment of biologists –embryologist. Such a potential method is determination of the metabolic profile of amino acids of embryos by analysing the spent media in which they were cultivated with Reversed Phase Chromatography on Ultra High-Performance Liquid Chromatograph in combination with Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. Embryos were cultured under different conditions – 5% or 20% O₂. Results showed that by lowering oxygen concentration to 5 % we can increase biological potential of optimal embryos for implantation and pregnancy. We determined that cultivation of embryos with increased oxygen concentration (20%) affects the metabolism of lower quality embryos, which causes an increased turnover of the amino acids.

(83 pages/ 26 figures/ 18 tables/ 79 references/ original in: Croatian)

Keywords: blastocyst, embryo morphology, aminoacid metabolism, *in vitro* fertilization, embryotransfer

Supervisor: Patrik Stanić, Ph.D.

Reviewers:

Marina Šprem Goldštajn, Ph.D., Assoc.Prof., School of Medicine, University of Zagreb

Vesna Benković, Ph.D., Full Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Domagoj Đikić, Ph.D., Full Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. LITERATURNI PREGLED | 2 |
| 2.1. Utjecaj snižene koncentracije kisika na razvoj humanih zametaka..... | 2 |
| 2.2. Procjena kvalitete zametaka | 4 |
| 2.2.1. Procjena morfokinetike | 4 |
| 2.2.2. Procjena morfologije i zrelosti oocita | 5 |
| 2.2.3. Procjena fertilizacije (zigote) | 7 |
| 2.2.4. Procjena diobe zametaka – stanični stadiji..... | 9 |
| 2.2.5. Procjena 4. dan – stadij morule | 11 |
| 2.2.6. Procjena 5. dan – stadij blastociste..... | 12 |
| 2.3. Embrionalni metabolizam..... | 14 |
| 2.3.1. Metabolizam zigota i ranih zametaka do 3. dana | 15 |
| 2.3.2. Metabolizam blastocista..... | 16 |
| 2.3.3. Aminokiseline | 16 |
| 2.3.4. Profil aminokiselina u humanim zamecima | 18 |
| 2.3.5. Tiha embrionalna hipoteza | 19 |
| 3. ISPITANICE, MATERIJALI I METODE | 20 |
| 3.1. Ispitanice..... | 20 |
| 3.2. Randomizacija | 23 |
| 3.3. Stimulacija | 24 |
| 3.4. Kultivacija zametaka | 24 |
| 3.4.1. Aspiracija folikula (punkcija)..... | 24 |
| 3.4.2. Analiza ejakulata | 26 |
| 3.4.3. Oplodnja metodom <i>in vitro</i> fertilizacije (IVF)..... | 27 |
| 3.4.4. Oplodnja metodom intracitoplazmatske spermalne injekcije | 27 |
| 3.4.5. Provjera oplodnje (1.dan kultivacije) | 28 |
| 3.4.6. Provjera diobe (2. i 3. dan kultivacije) | 29 |
| 3.4.7. Provjera diobe (5.dan kultivacije) i embriotransfer | 29 |
| 3.4.8. Priprema uzorka za analizu aminokiselina..... | 31 |
| 3.4.9. Kontrole..... | 31 |
| 3.5. HPLC-MS/MS | 32 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.5.1. | Priprema uzoraka..... | 35 |
| 3.5.2. | Kromatografska separacija..... | 37 |
| 3.5.3. | Analiza aminokiselina tehnikom spektrometrije masa..... | 39 |
| 3.5.4. | Pregled rezultata..... | 40 |
| 3.6. | Statistička analiza..... | 40 |
| 4. | REZULTATI..... | 41 |
| 4.1. | Morfološka procjena kvalitete zametaka..... | 42 |
| 4.1.1. | Klinički parametri..... | 42 |
| 4.1.2. | Embriološki parametri..... | 42 |
| 4.1.3. | Klinički i embriološki parametri s obzirom na dobne skupine..... | 46 |
| 4.2. | Procjena kvalitete zametaka analizom aminokiselina..... | 51 |
| 4.2.1. | Usporedna procjena metabolizma svih zametaka..... | 51 |
| 4.2.2. | Usporedna procjena metabolizma zametaka koji su rezultirali trudnoćom..... | 51 |
| 4.2.3. | Usporedna procjena metabolizma zametaka sa najboljom morfološkom ocjenom..... | 51 |
| 5. | RASPRAVA..... | 60 |
| 5.1. | Utjecaj snižene koncentracije kisika na razvoj optimalnih zametaka..... | 61 |
| 5.1.1. | Klinički parametri..... | 61 |
| 5.1.2. | Embriološki parametri..... | 63 |
| 5.2. | Utjecaj snižene koncentracije kisika na metabolizam aminokiselina optimalnih zametaka..... | 65 |
| 5.2.1. | Usporedna procjena metabolizma svih zametaka..... | 66 |
| 5.2.2. | Usporedna procjena metabolizma zametaka koji su rezultirali trudnoćom..... | 67 |
| 5.2.3. | Usporedna procjena metabolizma zametaka s najboljom morfološkom ocjenom..... | 68 |
| 5.2.4. | Tiha embrionalna hipoteza..... | 70 |
| 6. | ZAKLJUČCI..... | 72 |
| 7. | POPIS LITERATURE..... | 73 |
| 8. | ŽIVOTOPIS AUTORA..... | 80 |
| 9. | PRILOZI..... | 81 |

1. UVOD

Razvojem sekvencionalnih medija za kultiviranje blastocista i programa krioprezervacije uspješnost postupaka *in vitro* oplodnje znatno je porasla, no još uvijek se preko 70% zametaka ne implantira. Jedan od razloga tome je možda način utvrđivanja optimalnog zametka za prijenos u materiče (embriotransfer) koji se temelji isključivo na procjeni morfologije i kinetike diobe zametka. Takva procjena podliježe subjektivnoj ocjeni embriologa i govori nam vrlo malo o fiziologiji zametka. Iz tih razloga potrebno je utvrditi dodatnu metodu za odabir najvrijabilnijeg zametka za embriotransfer koja će biti objektivna (automatizirana), brza (ograničeno vrijeme do prijenosa zametaka u materiče) i neinvazivna (rad s humanim zametcima).

Cilj ovog istraživanja je utvrditi da li upotreba inkubatora s 5% O₂ povećava biološki potencijal zametaka odnosno stopu implantacije te da li pritom potrebne parametre možemo preciznije odrediti pomoću procjene morfologije i/ili metaboličkog profila samog zametka. Specifičan cilj ovog istraživanja je utvrditi metabolički profil aminokiselina optimalnog zametka odnosno onog koji se implantirao. Da bismo dobili profil aminokiselina koji odgovara optimalnom zametku s najvećim biološkim potencijalom za implantaciju potrebno je kultivirati zametke i s 5% O₂ i s 20% O₂ te utvrditi kako različiti uvjeti utječu na metabolizam zametka i njegovu implantaciju.

Pretpostavka je da je udio kisika od 5% bliži uvjetima u kojima se nalazi zametak *in vivo* i iz toga razloga generira kvalitetnije zametke. Druga pretpostavka je da vitalan i kvalitetan preimplantacijski zametak funkcionira na nižoj razini metaboličkog i hranjivog prometa (Leese 2002). Tiha embrionalna hipoteza (Leese 2002) je postavljena na temelju eksperimenata izvedenih na humanim zametcima kultiviranim isključivo u inkubatorima s 20% O₂ te je potrebno utvrditi potencijalne razlike pri inkubaciji s 5% O₂.

Rezultati ovog istraživanja trebali bi nam pomoći utvrditi koji uvjeti kulture za kultivaciju humanih zametaka *in vitro* povećavaju postotak optimalnih zametaka s najvećim biološkim potencijalom za implantaciju. Također ćemo utvrditi da li je dosadašnja metoda ocjenjivanja zametaka pomoću morfologije i kinetike diobe zametaka u skladu sa stvarnim fiziološkim stanjem zametka.

2. LITERATURNI PREGLED

Metode medicinski pomognute oplodnje (MPO) najčešći su i najvažniji način liječenja neplodnosti. Obuhvaćaju sve metode liječenja kojima se pomaže da dođe do oplodnje, trudnoće i porođaja. Uključuje homologne i heterologne postupke, odnosno liječenje gametama neplodnog para ili jednom od gameta darovatelja (darovateljica). Izvantjelesna oplodnja – IVF (*in vitro* fertilizacija) najvažnija je metoda medicinski pomognute oplodnje. Tehnološkim napretkom u embriološkom laboratoriju usvojene su nove, napredne metode MPO-a kao što su krioprezervacija gameta (oocita i spermija) i zametaka, produžena kultura zametaka (stvaranje blastocista), morfometrijska analiza embrija, analiza metabolizma embrija i biljega kvalitete, izvantjelesno dozrijevanje oocita, biopsija embrija i ostale nove mikromanipulacijske tehnologije (Šimunić i sur. 2012).

2.1. Utjecaj snižene koncentracije kisika na razvoj humanih zametaka

Rođenje zdravog djeteta rođenog u terminu i normalne težine cilj je pomognute oplodnje (Gardner 2016).

Razvojem medija za kultivaciju zametaka poboljšali su se uvjeti kultivacije te se zameci češće kultiviraju do stadija blastociste. Kultiviranjem do stadija blastociste postiže se bolji sinhronicitet između uterusa i zametka kao i bolja prirodna selekcija vijabilnih zametaka te posljedično više stope implantacije (Glujovsky i sur. 2016). Također je olakšana morfološka procjena zametaka obzirom na veću ekspanziju blastocela i bolju diferencijaciju embrionalnog čvorića. Produžena kultura do stadija blastociste nam dakle omogućuje bolji probir što je preduvjet za embriotransfer samo jedne blastociste (engl. single embryo transfer - SET). Embriotransfer jedne blastociste znatno povećava postotak implantacije i živorođene djece, a pritom se broj više plodnih trudnoća smanjuje kao i broj pobačaja (Gardner 2016). Više plodne trudnoće nose veći rizik od pobačaja i prijevremenih poroda. Razvojem kvalitetnih programa krioprezervacije poput vitrifikacije možemo također kvalitetno kriopohraniti višak zametaka i povećati kumulativnu stopu živorođene djece (engl. cumulative live birth rate – CLBR).

Nažalost, produženo kultiviranje također može biti izvor stresa za humane zametke. Izvori stresa mogu biti faktori poput pH, promjene temperature, izloženost atmosferskom kisiku

(20%) (Kovačić i sur. 2010) kao i razvoj toksina u mediju za kultivaciju zbog statične prirode načina kultivacije. Kako bi se zadovoljili uvjeti za postavljanje dobre kulture blastociste, laboratorij za kliničku embriologiju mora imati razvijen sustav kontrole kvalitete, sustavni nadzor temperature, CO₂ i kvalitete zraka te izloženost prirodnom svjetlu mora biti svedena na minimum. Potrebno je koristiti sloj parafinskog ulja kao zaštitu od evaporacije medija te imati dovoljan broj inkubatora sukladan broju pacijenata. Dobra organizacija laboratorija u pogledu prostora, vrste i količine opreme nužan je preduvjet za osiguranje stabilnosti uvjeta kultivacije i dobre rezultate.

Najvažnija varijabla za razvoj humanih zametaka je svakako kisik koji je moćan regulator staničnog i embrionalnog razvoja. Embrionalni razvoj do stadija blastociste možemo značajno poboljšati modificiranjem udjela kisika u kojem su zamci kultivirani do 5-tog dana (Kovačić i Vlaisavljević 2008).

Posljednjih 30 godina laboratoriji za kliničku embriologiju koriste atmosferski kisik (~20%) u kombinaciji s 5% - 6% CO₂ za kultiviranje humanih zametaka *in vitro*. Još 1993. utvrđeno je da postotak kisika od jajovoda do uterusa ženskog spolnog sustava većine sisavaca varira od 2% - 8% (Fischer i Bavister 1993). Uzimajući u obzir da se trudimo u svakom koraku kultivacije oponašati fiziološke uvjete *in vivo*, ovakva povećana i nefiziološka koncentracija kisika može utjecati na razvoj optimalnih zametaka. Smanjenjem atmosferskog kisika (20%) na fiziološku razinu (5%) kakva je prisutna u jajovodima i uterusu (2-8%) (Fischer i Bavister 1993) stvaranje visoko reaktivnih citotoksičnih kisikovih radikala može biti značajno smanjeno (Fujitani i sur. 1997). Reaktivni kisikovi radikali (Botros i sur. 2008; Kwon i sur. 1999) mogu uzrokovati oštećenja organela i staničnih membrana (Fujitani i sur. 1997, Kwon i sur. 1999), direktna i indirektna oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (engl. deoxyribonucleic acid – DNA) (Iwata i sur. 2000) te promjenu genske ekspresije (Harvey i sur. 2004). Visok postotak kisika (20%) u kulturama *in vitro* stvara više kisikovih slobodnih radikala (engl. reactive oxygen species - ROS) (Goto i sur. 1993). Usprkos endogenim zaštitnim mehanizmima oocita i zametaka koje uključuju aktivnost superoksid dismutaze, katalaze i peroksidaze (El Mouatassim i sur. 1999), slobodni kisikovi radikali najviše pogađaju mitohondrijsku DNA, proteine i lipide kao i citoplazmu gdje mijenjaju omjer glutaciona i glutation disulfida (Orrenius i sur. 1992) te agregiraju komponente citoskeleta i kondenzate endoplazmatskog retikuluma (Tarin 1996). Oksidativni stres uzrokuje fragmentaciju DNA (Yang i sur. 1998), apoptozu, usporavanje ili zaustavljanje razvoja zametka (Johnson i Nasr-Esfahani 1994) te kasnije može

utjecati na vitalnost trudnoće (Catt i Henman 2000). Cat i Henman (2000) predložili su tri metode za minimaliziranje štetnog učinka oksidativnog stresa: 1) smanjenje postotka kisika tijekom kultivacije zametaka; 2) korištenje kultivacijskih medija s povećanim udjelom antioksidanata; 3) kraći period inseminacije kako bi se smanjio oksidativni stres uzrokovan metabolizmom spermija. Kultivacijom humanih zametaka u uvjetima kulture *in vitro* sa sniženom razinom kisika (5%) povećava se stopa embrionalnog razvitka do stadija blastociste, stopa diobe zametaka, stopa blastulacije, broj stanica blastociste, veći broj blastocista koje su sposobne preživjeti krioprezervaciju te broj visoko kvalitetnih blastocista (Kovačić i sur. 2010).

Randomizirana istraživanja nisu našla razlike u stopi implantacije i trudnoća (Ciray i sur. 2009; Kea i sur. 2007). Meta-analiza istraživanja utjecaja snižene razine kisika (5%) na razvoj humanih zametaka utvrdila je da su rezultati kontradiktorni (Gomes Sobrinho i sur. 2011) te da je potrebno provesti dodatna istraživanja prije donošenja konačnog zaključka.

2.2. Procjena kvalitete zametaka

Metode određivanja kvalitete, odnosno biološkog potencijala zametaka za implantaciju sastoje se od procjene morfologije: oocita, zigota i zametaka u diobi 2., 3., 4. i/ili 5. dana te kinetike njihove diobe.

Od 2011. postoji internacionalni konsenzus o ocjenjivanju morfologije zametaka kako bi se olakšala interpretacija rezultata različitih istraživanja (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011).

2.2.1. Procjena morfokinetike

Procjenu svakodnevno vrši biolog-embriolog pomoću invertnog mikroskopa. Standardizirano vrijeme procjene je neophodno kako bi se mogla odrediti kvaliteta zametaka na temelju kinetike diobe zametaka. Vrijeme procjene se određuje u odnosu na vrijeme inseminacije odnosno intracitoplazmatske mikroinjekcije (Tablica 1.) Kvalitetan zametak ima pravilnu kinetiku diobe.

Tablica 1. Vrijeme procjene fertilizacije oocita i zametaka te očekivani stadij diobe

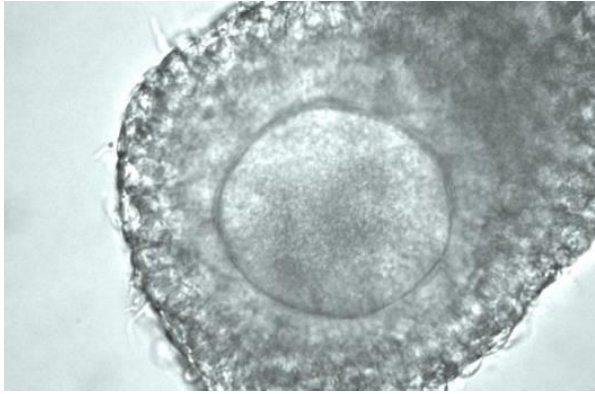
| Vrsta procjene | Vrijeme (sati nakon inseminacije) | Očekivani stadij diobe |
|-----------------------|--|---|
| Oplodnja | 17±1 | Pronuklearni stadij |
| Singamija | 23±1 | 50% zigota u singamiji, 20% u 2 st. stadiju |
| Rana dioba | 26±1 h nakon ICSI-ja 28±1 h nakon IVF-a | 2-staničan stadij |
| Dioba 2.dan | 44±1 | 4-staničan stadij |
| Dioba 3.dan | 68±1 | 8-staničan stadij |
| Dioba 4.dan | 92±2 | Morula (16-32 blastomera) |
| Dioba 5.dan | 116±2 | Blastocista (24-322 blastomere) |

(Alpha Scientists in Reproductive & Embryology, 2011)

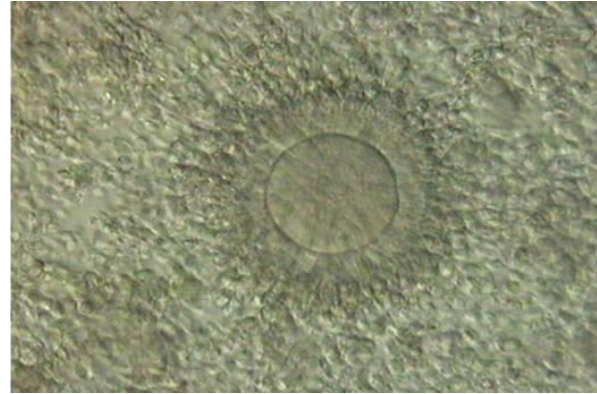
2.2.2. Procjena morfologije i zrelosti oocita

Prema konsenzusu pri ocjenjivanju treba procijeniti zrelost (metafaza I, metafaza II, profaza I i atrezija) oocita. Kompleks kumulus-oocita (engl. cumulus-oocyte complex, COC) nezrelih oocita karakterizira kompaktna korona radiata te kompaktne stanice kumulusa (Slika 1.a) za razliku od COC-a zrele oocite s raspršenom koronom radiatom i raspršenim stanicama kumulusa (Slika 1.b).

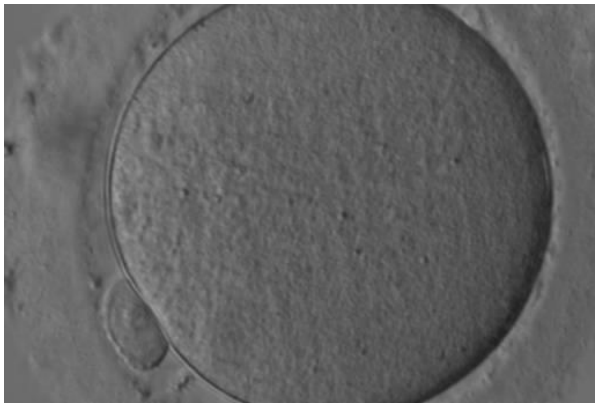
Prisutnost stanica kumulusa i korone nam onemogućavaju identifikaciju polarnog tjelešca u perivitelinom prostoru koje je indikator završetka mejoze I s arestom u metafazi II (MII). Točnu zrelost oocita, odnosno prisutnost polarnog tjelešca možemo utvrditi tek kada denudiramo oocite pomoću enzima hijaluronidaze i mehanički pomoću pipetiranja. Zrela oocita je u MII fazi kada možemo potvrditi postojanje polarnog tjelešca u perivitelinom prostoru (Slika 1.c). Takva oocita ima definirano diobeno vreteno (Slika 1.d) Nezrela oocita nema polarno tjelešce već intracitoplazmatski nukleus – germinativni vezikul (GV) (Slika 1.e) i nalazi se u profazi I (PI) prve mejotičke diobe. Prijelazno zrele oocite nemaju niti GV niti polarno tjelešce te se nalaze u metafazi I (Slika 1.f) (Magli i sur. 2012).



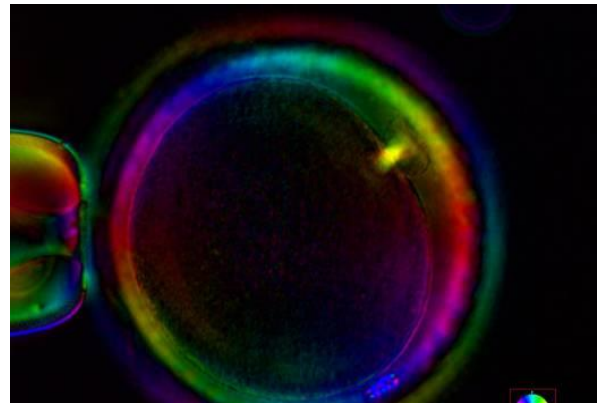
a



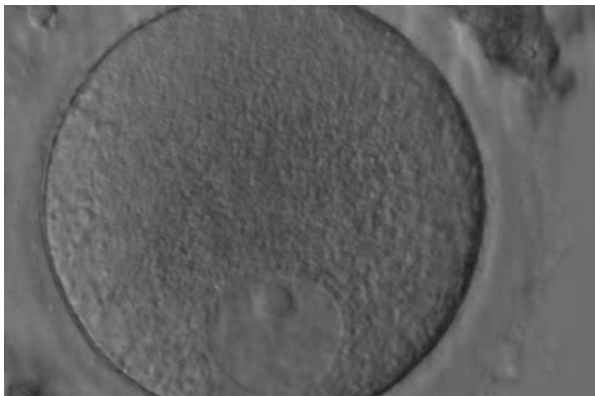
b



c



d



e



f

Slika 1. Procjena zrelosti oocita prema internacionalnom konsenzusu (Alpha Scientists in Reproductive & Embryology, 2011): a) Kompleks kumulus-oocita nezrele oocite b) Kompleks kumulus-oocita zrele oocite c) Zrela oocita d) Diobeno vreteno oocite e) Nezrela oocita f) Prijelazno zrela oocita

Optimalna oocita (Slika 2.) je sferičnog oblika s uniformnom zonom pellucidom te uniformnom, prozirnom citoplazmom bez inkluzija i proporcionalno velikim polarnim tjelešcem. Izgled i specifičnosti kumulus-oocita kompleksa, zone pellucide i perivitelinog

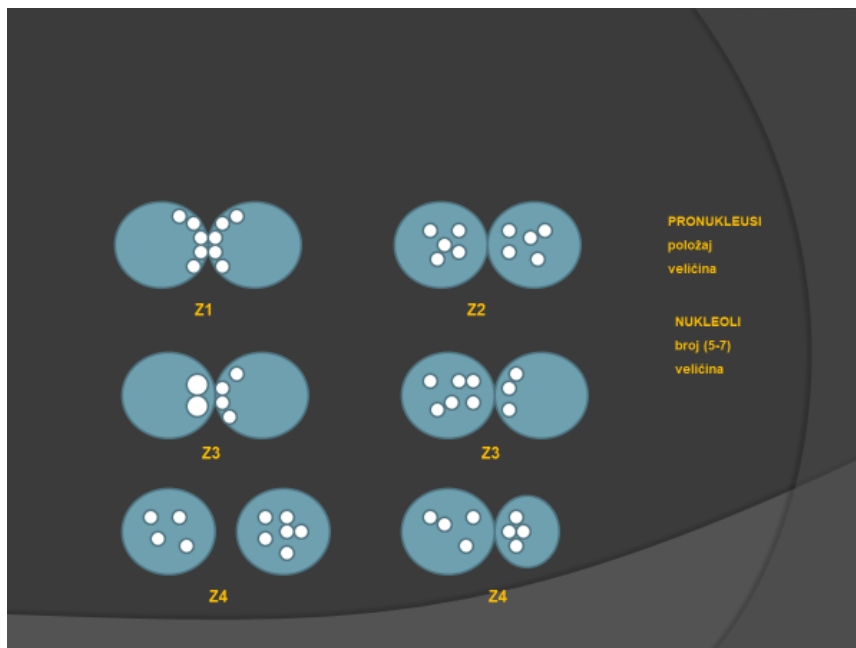
prostora ne dovode se u vezu s razvojnom kompetencijom zametaka. Oocite s abnormalno velikim polarnim tjelešcem se ne bi trebale stavljati na oplodnju s obzirom na povećani rizik od aneuploidija. Granularnost citoplazme, odnosno grupiranje organela dovodi se u vezu sa slabijim implantacijskim potencijalom. Prisutnost diskova glatkog endoplazmatskog retikuluma (Cauffman i sur. 2009) povezana je s rizikom od ozbiljnih abnormalnih ishoda (Otsuki i sur. 2004) te se takve oocite ne bi trebale stavljati na oplodnju, odnosno ne kultivirati dalje u slučaju *in vitro* fertilizacije (engl *in vitro* fertilization – IVF). Prisutnost velikih vakuola ($\geq 14 \mu\text{m}$ u promjeru) može utjecati na manju stopu blastulacije s obzirom da ometaju simetriju diobe zametka (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011).



Slika 2. Optimalna oocita

2.2.3. Procjena fertilizacije (zigote)

Pri provjeri oplodnje treba utvrditi postojanje 2 pronukleusa i 2 polarna tjelešca te ocijeniti veličinu i položaj pronukleusa kao i broj, veličinu i položaj nukleolarnih prekursorskih tjelešaca (Z1, Z2, Z3 i Z4) (Scott 2003; Scott i sur. 2000). Razmaknuti pronukleusi, mikropronukleusi te pronukleusi različite veličine prediktori su lošijeg razvoja zametaka (Slika 3.) (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011).



Slika 3. Morfologija pronukleusa u zigoti (Scott i sur. 2000).

Optimalna fertilizirana oocita je sferičnog oblika s dva polarna tjelešca te dva centralno orijentirana pronukleusa iste veličine s jasno razdvojenim membranama. Pronukleusi moraju sadržavati jednak broj nukleola (5-7) slične veličine centralno orijentiranih duž preklapanja membrana (Slika 4.).



Slika 4. Optimalna zigota (Magli i sur. 2012)

2.2.4. Procjena diobe zametaka – stanični stadiji

Kod zametaka u diobi 2. i 3. dana utvrđuje se staničnost zametaka (broj blastomera), jednakost blastomera, stupanj fragmentacije citoplazme te eventualno postojanje multinukleacije. Stanični stadij zametaka podrazumijeva raspon od 2-staničnog zametka do zametka u kompakciji odnosno ranu morulu s 8-16 blastomera.

Najvažniji kriterij pri ocjeni diobe zametaka je broj blastomera. U Tablici 1. možemo vidjeti očekivani broj blastomera s obzirom na stadij diobe. Zameci koji se dijele sporije ili brže imaju smanjeni implantacijski potencijal. Također je utvrđeno da bolji implantacijski potencijal imaju zametci koji u dvo-, četvero- i osmero-staničnim stadijima imaju podjednake blastomere (Slika 5.) dok se u neparnim stadijima i očekuje jedna veća blastomera, odnosno blastomera koja se tek treba podijeliti (Slika 6.).

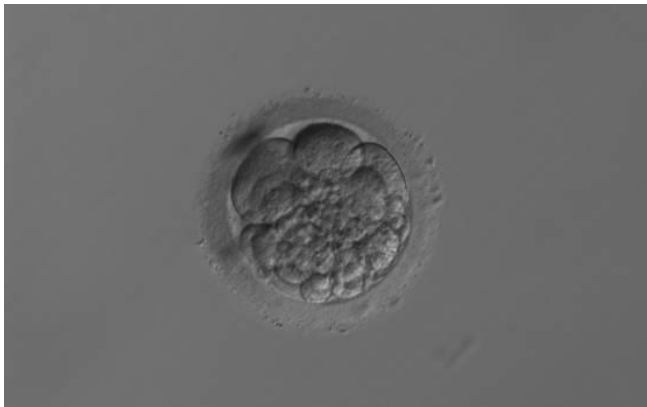


Slika 5. Četverostanični zametak s podjednakim blastomerama



Slika 6. Trostanični zametak s jednom većom blastomerom koja se još nije podijelila

Fragment se definira kao mali dio citoplazme ($<45\mu\text{m}$) okružen staničnom membranom koji ne sadrži DNA i najčešće se formira tijekom mitoze (Antczak i Van Blerkom 1999). Stupnjevi fragmentacije su definirani kao blagi ($\leq 10\%$), umjereni (10-25%) i teški ($\geq 25\%$). Fragmentacija od 25% odgovara veličini jedne blastomere. Također je bitno da li je fragmentacija raspršena po cijelom perivitelinom prostoru ili je lokalizirana. Povećani stupanj fragmentacije kao i raspršena fragmentacija negativno koreliraju sa stupnjem implantacije i smanjuju stopu blastulacije (Slika 7.) dok stupanj fragmentacije do 10% ne utječe na razvojni potencijal zametka.



Slika 7. Fragmentacija zametka veća od 25%

Multinukleacija se definira kao prisutnost više od jednog nukleusa u blastomeri uključujući i mikronukleuse. Procjena multinukleacije se vrši na 2. dan diobe. Dovoljno je utvrditi multinukleaciju u jednoj blastomeri. Multinukleacija se povezuje sa smanjenim implantacijskim potencijalom i povećanom vjerojatnosti kromosomskih abnormalnosti.



Slika 8. Multinukleacija prisutna u obje blastomere

Sukladno preporukama donesen je konsenzus za ocjenjivanje staničnih zametaka (Tablica 2.) (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011).

Tablica 2. Ocjenjivanje staničnih stadija zametaka prema konsenzusu

| Stupanj | Ocjena | Opis |
|---------|---------|---|
| 1 | Odličan | <ul style="list-style-type: none"> • $\leq 10\%$ fragmentacije • odgovarajuća veličina blastomera s obzirom na stadij diobe • bez multinukleacije |
| 2 | Srednji | <ul style="list-style-type: none"> • 10-25% fragmentacije • odgovarajuća veličina blastomera s obzirom na stadij diobe za većinu blastomera • bez multinukleacije |
| 3 | Loš | <ul style="list-style-type: none"> • teški stupanj fragmentacije ($\geq 25\%$) • veličina blastomera ne odgovara stadiju diobe • postojanje multinukleacije |

(Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011)

2.2.5. Procjena 4. dan – stadij morule

Kod morula se ocjenjuje stupanj kompakcije.

Proces kompakcije počinje već kod 8-staničnog zametka nestajanjem jasnih granica između blastomera. Kvalitetna morula sadrži 16-32 blastomera pri čemu su sve blastomere uključene u proces kompakcije kada i počinje aktivacija embrionalnog genoma (Slika 9.). Vanjske stanice zametka u kompakciji gube svojstvo totipotencije i pripremaju se za formiranje trofoektoderma nakon čega slijedi početak kavitacije i formacija blastociste (Cauffman i sur. 2009).



Slika 9. Idealna morula

Sukladno preporukama donesen je konsenzus za ocjenjivanje zametaka u stadiju morule (Tablica 3.) (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011).

Tablica 3. Ocjenjivanje zametaka u stadiju morule prema konsenzusu

| Stupanj | Ocjena | Opis |
|---------|---------|--|
| 1 | Odličan | • kompakcija u koju je uključen cijeli volumen zametka |
| 2 | Srednji | • kompakcija u koju je uključen gotovo cijeli volumen zametka |
| 3 | Loš | • disproporcionalna kompakcija u koju je uključeno manje od pola zametka |

(Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011)

2.2.6. Procjena 5. dan – stadij blastociste

Kultivacija zametaka do stadija blastociste omogućava nam bolju selekciju zametaka nakon genomske aktivacije i bolji sinhronicitet s endometrijem čime povećavamo šansu za ostvarivanje trudnoće. Bolji i lakši probir zametaka koji se razviju do stadija blastociste daje nam mogućnost za embriotransfer samo jedne blastociste uz istu uspješnost, ali manji rizik od više plodne trudnoće.

Između 4. i 5. dana razvoja u stadiju morule počinje se akumulirati tekućina između stanica te dolazi do procesa kavitacije, odnosno razvoja blastocela. Razvojem blastocela povećava se broj stanica i volumen blastociste dok se zona pellucida sve više istanjuje. Naposljetku dolazi do pucanja zone pellucide i procesa koji zovemo izlijeganje (engl. hatching) kada se blastocista u potpunosti oslobađa zone pellucide. Broj stanica u potpuno ekspanziranoj blastocisti varira između 24 i 322 stanice (Hardarson i sur. 2003). Vanjske stanice blastociste nazivamo trofoektodermom (engl. trophoctoderm - TE) dok stanice koje se nalaze u blastocelu i tvore malu nakupinu na jednom polu blastociste nazivamo embrionalni čvorić (engl. inner cell mass-ICM). Trofoektoderm je odgovoran za prihvatanje blastociste za endometriju, izlučivanje molekularnih faktora koji potpomažu implantaciju te iz njega naposljetku nastaje posteljica. Iz embrionalnog čvorića nastaje plod.

Kvalitetno ocjenjivanje blastocista je iznimno važno. Ocjenjuje se ekspanziranost blastociste, embrionalni čvorić te trofoektoderm.

Po stupnju razvijenosti odnosno ekspanziranosti blastocela razlikujemo ranu, razvijenu, ekspanziranu te blastocistu u izlijeganju. U slučaju da se blastocista nalazi u kolapsu ne može se ocijeniti te je potrebno pričekati 1-2 sata do ponovne reekspanzije kako bismo ju ocijenili. Idealna blastocista je potpuno ekspanzirana ili pak blastocista u izlijeganju s embrionalnim čvorićem ovalnog oblika s puno kompaktnih stanica u nakupini te trofoektodermom koji ima puno stanica koje stvaraju kohezivni sloj epitela (Slika 10.). Konsenzus za ocjenjivanje kvalitete blastocista opisan je u Tablici 4. (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011).

Tablica 4. Ocjenjivanje blastocista prema konsenzusu

| | Stupanj | Ocjena | Opis |
|------------------------|---------|----------------|--|
| Stupanj razvoja | 1 | | • rana blastocista |
| | 2 | | • razvijena blastocista |
| | 3 | | • ekspanzirana blastocista |
| | 4 | | • blastocista u izlijeganju |
| ICM | 1 | Odličan | • puno kompaktnih stanica u nakupini |
| | 2 | Srednji | • nekoliko stanica, slabo povezane |
| | 3 | Loš | • mali broj stanica |
| TE | 1 | Odličan | • puno stanica koje formiraju kohezivni epitel |
| | 2 | Srednji | • nekoliko stanica koje stvaraju slabo pričvršćen epitel |
| | 3 | Loš | • mali broj velikih stanica |

(Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011)

ICM - embrionalni čvorić; TE - trofoektoderm



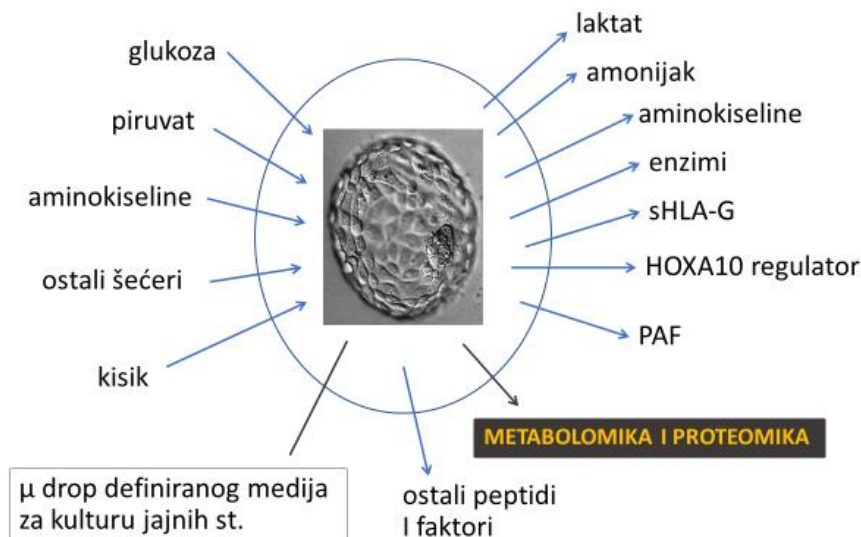
Slika 10. Idealna blastocista 5.dan

Po definiciji nevijabilan zametak je onaj koji se prestao dijeliti posljednja 24 sata ili onaj u kojem su stanice degenerirale ili su lizirane.

2.3. Embrionalni metabolizam

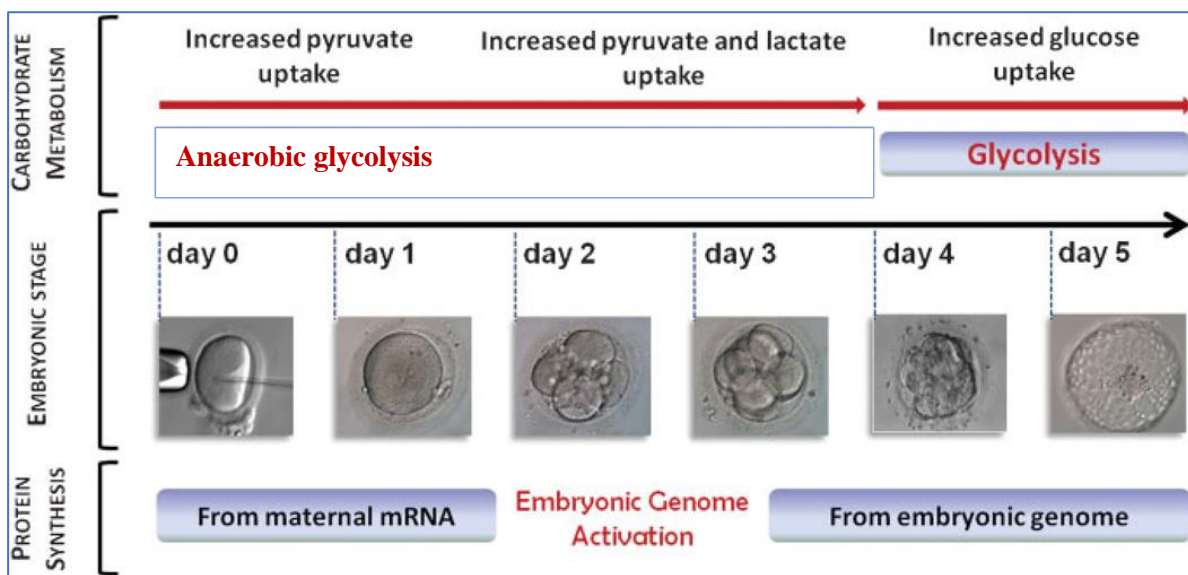
Potencijalni biomarker implantacijskog potencijala je embrionalni metabolizam (Gardner i Wale 2013). Metabolomika nam pruža jedinstvenu mogućnost istraživanja veze između genotipa nekog organizma i njegovog fenotipa obzirom da je metabolom krajnji produkt genske ekspresije i predstavlja vezu između fiziologije organizma i utjecaja okoliša (Botros i sur.2008). Regulacija proizvodnje energije je od životne važnosti za svaki organizam.

Metabolizam zametaka možemo mjeriti analizom unošenja i korištenja ugljikohidrata i aminokiselina u mediju u kojem su zametci bili pohranjeni (Slika 11.) Dosadašnja istraživanja su dokazala da samo nekoliko sati inkubacije zametaka u suboptimalnom okolišu tj. mediju kojem nedostaju aminokiseline i vitamini, može prouzročiti metaboličke promjene koje će se odraziti na razvoj zametaka, smanjenu mogućnost implantacije ili utjecati na razvoj fetusa (Lane i Gardner 1996; Lane i Gardner 1998; Gardner i Wale 2013).



Slika 11. Obrtaj glavnih nutrijenata tijekom kultivacije zametaka (Trounson i Gardner 1993)

Postoje dva puta proizvodnje energije koja su neophodna za embrionalni metabolizam: aerobna glikoliza ili ciklus trikarboksilnih kiselina (Krebsov ciklus) i anaerobna glikoliza. Anaerobna glikoliza dominira u ranim stadijima diobe zametaka pri čemu su piruvat i laktat glavni izvori energije, a korištenje glukoze je svedeno na minimum. Aerobna glikoliza i sposobnost metaboliziranja glukoze raste nakon aktiviranja embrionalnog genoma nakon 3. dana diobe (Telford i sur. 1990). Razina biosinteze i mitoze se povećava nakon aktivacije embrionalnog genoma i rasta blastocela pa tako i energetske potrebe zametka (Gardner i Wale 2013; Uyar i Seli 2014) (Slika 12.).



Slika 12. Metabolizam zametka tijekom kultivacije kroz 5 dana (Uyar i Seli 2014).

2.3.1. Metabolizam zigota i ranih zametaka do 3. dana

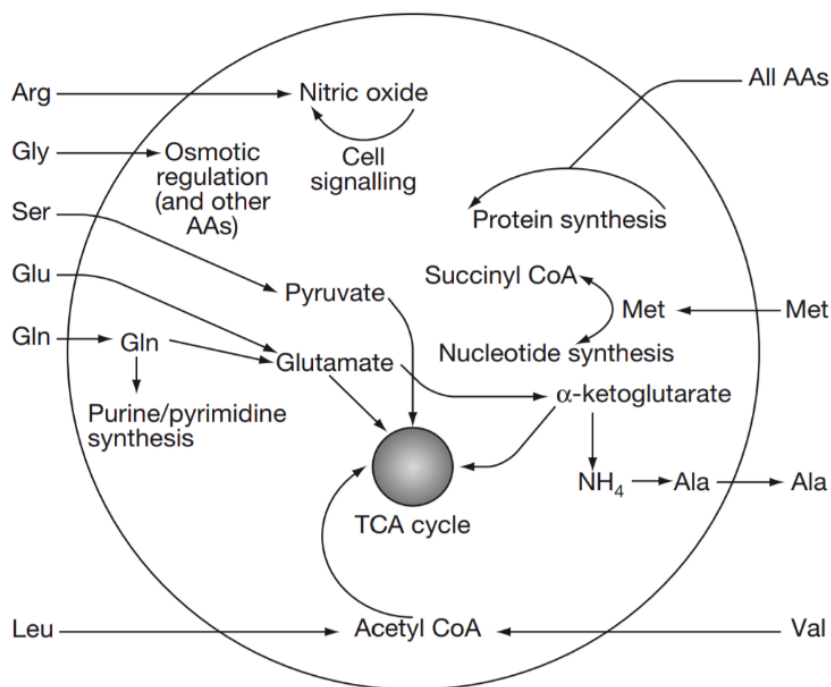
Metabolizam ranih zametaka bazira se na niskoj razini oksidacije piruvata, laktata i specifičnih aminokiselina. Nakon ovulacije, odnosno u *in vitro* uvjetima nakon aspiracije, oocita je okružena stanicama kumulusa koje aktivno proizvode piruvat i laktat iz glukoze. Visoka koncentracija piruvata i laktata te niska koncentracija glukoze u blizini oplodene jajne stanice zadržava se i nakon odstranjivanja stanica kumulusa. Rani zametak odlikuje se visokim omjerom ATP:ADP-a (engl adenosin triphosphat; adenosin diphosphat) koji inhibira fosfofrukto-kinazu koja ograničava protok glukoze kroz glikolitički put prije kompakcije (Gardner i Wale 2013). Tijekom ovog razdoblja dolazi do replikacije DNA i stanične diobe, ali još uvijek nema porasta staničnog volumena niti mase zbog čega su energetske potrebe zametka snižene.

2.3.2. Metabolizam blastocista

Nakon kompakcije zametak pokazuje povećanu potrošnju kisika i povećava se kapacitet iskorištavanja glukoze kao izvora energije. Povećanje potrošnje kisika je najvjerojatnije posljedica potrošnje energije potrebne za stvaranje i ekspanziju blastocela dok je povećana potrošnja glukoze odraz povećane potražnje za biosintetičkim prekursorima. Posljedično, dolazi do redukcije ATP:ADP omjera i povećanja AMP-a (engl. adenosin monophosphat) što dovodi do pozitivnog alosteričkog efekta fosfofrukto-kinaze i povećanje protoka glukoze kroz proces glikolize. Iako zametak u stadiju blastociste koristi glukozu kao primarni izvor energije, oksidira samo 50% glukoze dok ostatak pretvara u laktat. Ovakav alternativni oblik 'aerobne glikolize' također nalazimo kod brzo proliferirajućih stanica poput tumora i predstavlja adaptaciju blastociste brzom proliferaciji i budućoj implantaciji tijekom koje će se zametak naći u uvjetima anoksije (Gardner i Wale 2013).

2.3.3. Aminokiseline

Aminokiseline imaju više funkcija tijekom razvoja zametaka (Liu i Foote 1995): one su biosintetički prekursori (Crosby i sur. 1988), puferiraju intracelularni pH zametka (Edwards i sur. 1998), antioksidanti su (Liu i Foote 1995), sudjeluju u signalizaciji i diferencijaciji (Lane i Gardner 2005), služe kao izvori energije (Rieger i sur. 1992) i reguliraju metaboličke funkcije (Lane i Gardner 2005). S obzirom na sve funkcije, aminokiseline predstavljaju odličan parametar za određivanje vijabilnosti zametaka (Houghton i sur. 2002; Brison i sur. 2004) kao i piruvat (Gardner i sur. 2001) te glukoza (Summers i Biggers 2003)(Slika 13.).



Slika 13. Funkcije aminokiselina tijekom razvoja zametaka (Sturmey i sur. 2008)

Aminokiseline dijelimo na esencijalne i ne-esencijalne aminokiseline (Tablica 5.), odnosno aminokiseline koje organizam ne može sam sintetizirati ("de novo", iz početka), nego ih mora unijeti hranjenjem i aminokiseline koje nastaju u tijelu biokemijskim pretvorbama iz esencijalnih. Kada govorimo o zamecima, sve aminokiseline su esencijalne i moramo ih unijeti suplementacijom medija za kulturu zametaka (Summers i Biggers 2003). Indirektnim metodama je dokazano da u ljudskom reproduktivnom traktu nalazimo svih 20 aminokiselina (Tay i sur. 1997). Stoga je vrlo bitno da suplementacijom medija omogućimo dostatnu koncentraciju aminokiselina koja oponaša fiziološku okolinu reproduktivnog trakta (Leese 1991).

Tablica 5. Podjela na ne-esencijalne i esencijalne aminokiseline

| NE-ESENCIJALNE AMINOKISELINE | ESENCIJALNE AMINOKISELINE |
|---|--------------------------------------|
| alanin | fenilalanin |
| arginin | histidin |
| asparagin | izoleucin |
| aspartat | leucin |
| cistein | lizin |
| glicin | metionin |
| glutamat | treonin |
| glutamin | triptofan |
| prolin | valin |
| serin | |
| tirozin | |

2.3.4. Profil aminokiselina u humanim zamecima

Kvantitativna analiza aminokiselina je danas sve češće korištena metoda koja pronalazi vrlo široku primjenu u kliničkoj dijagnostici (Mangge i sur. 2016) te medicinskim i biomedicinskim istraživanjima (Furtado i sur. 2017).

Profil aminokiselina (engl. amino acid profile - AAP) predstavlja trošenje i/ili pojavu odnosno obrtaj aminokiselina u mediju za kultivaciju zametaka. Separaciju, identifikaciju i određivanje aminokiselina u kompleksnim smjesama spojeva možemo izvršiti pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s tandemskom spektrometrijom masa (engl. High pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry - HPLC-MS/MS). Analitičkom metodom koja koristi HPLC-MS/MS uređaj moguće je kvantitativno izmjeriti brojne metabolite niske molekularne mase, a za analizu je potreban mali volumen uzorka (samo 40 µl), pri čemu se može odrediti istovremeno 45 aminokiselina u kratkom vremenu što ovu metodu čini selektivnom, brzom, točnom i preciznom.

Pripremljeni uzorci za analizu aminokiselina unose se u sustav tekućinskog kromatografa gdje se razdvajaju na kromatografskoj koloni, potom se dalje analiziraju spektrometrijom masa kroz ionizaciju uzoraka, njihovo fragmentiranje i dodatno razdvajanje. Nastali ionizirani fragmenti detektiraju se na temelju odnosa mase i naboja iona. Svaki nastali ionizirani fragment karakteriziran je specifičnim retencijskim vremenom. Pojedine aminokiseline identificiraju se pomoću karakterističnih fragmenata sa specifičnim prijelazima masa (omjeri mase i naboja), dok se kvantitativna analiza vrši usporedbom intenziteta iona aminokiseline s pripadajućim internim standardom.

Houghton i suradnici (2002) prvi su upotrijebili metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) kako bi analizirali obrtaj aminokiselina humanih zametaka kultiviranih do stadija blastociste. Utvrdili su da postoji različiti profil aminokiselina zametaka koji su se razvili do stadija blastociste za razliku od onih koji su stali u razvoju. Profili alanina, arginina, asparagina, glutamina i metionina pokazali su se kao dobri prediktori za razvoj blastocista. Brison i suradnici (2004) pokazali su da nisu iste aminokiseline bitne za ostvarivanje kliničkih trudnoća (engl. clinical pregnancy rate - CPR) i rođenje živog djeteta (engl. live birth rate – LBR). Dobri prediktori trudnoća su asparagin, glicin i leucin. Potencijalno objašnjenje je činjenica da nisu sve blastociste vijabilne. Profili aminokiselina ovise o više faktora - stadiju razvoja zametaka, sastavu medija za kultivaciju i koncentraciji kisika.

2.3.5. Tiha embrionalna hipoteza

„Tiha embrionalna hipoteza“ (engl. Quiet embryo hypothesis) (Leese 2002) pretpostavlja da vijabilni zameci imaju 'tiši' metabolizam od zametaka u zastoju (Houghton i sur. 2002). Prema hipotezi zameci koji imaju nisku metaboličku aktivnost predstavljaju fiziologiju manjeg stresa pa su tako vijabilni zameci oni koji pokazuju nizak obrtaj metabolita. Međutim, novija istraživanja pokazuju da je vijabilnost zametaka povezana s povećanom metaboličkom aktivnosti (Wale i Gardner 2012; Gardner i Wale 2013). Razlog tome može biti kultivacija zametaka pri izvođenju istraživanja u uvjetima kulture isključivo s 20% O₂ čime su zameci bili izloženi nefiziološkim uvjetima i stresu. Atmosferski kisik ima značajan negativni učinak na ekspresiju gena blastociste (Gardner i Lane 2005), embrionalni proteom (Katz-Jaffe i sur. 2005) i metabolizam pri čemu direktno utječe na obrtaj aminokiselina i ugljikohidrata (Wale i Gardner 2012).

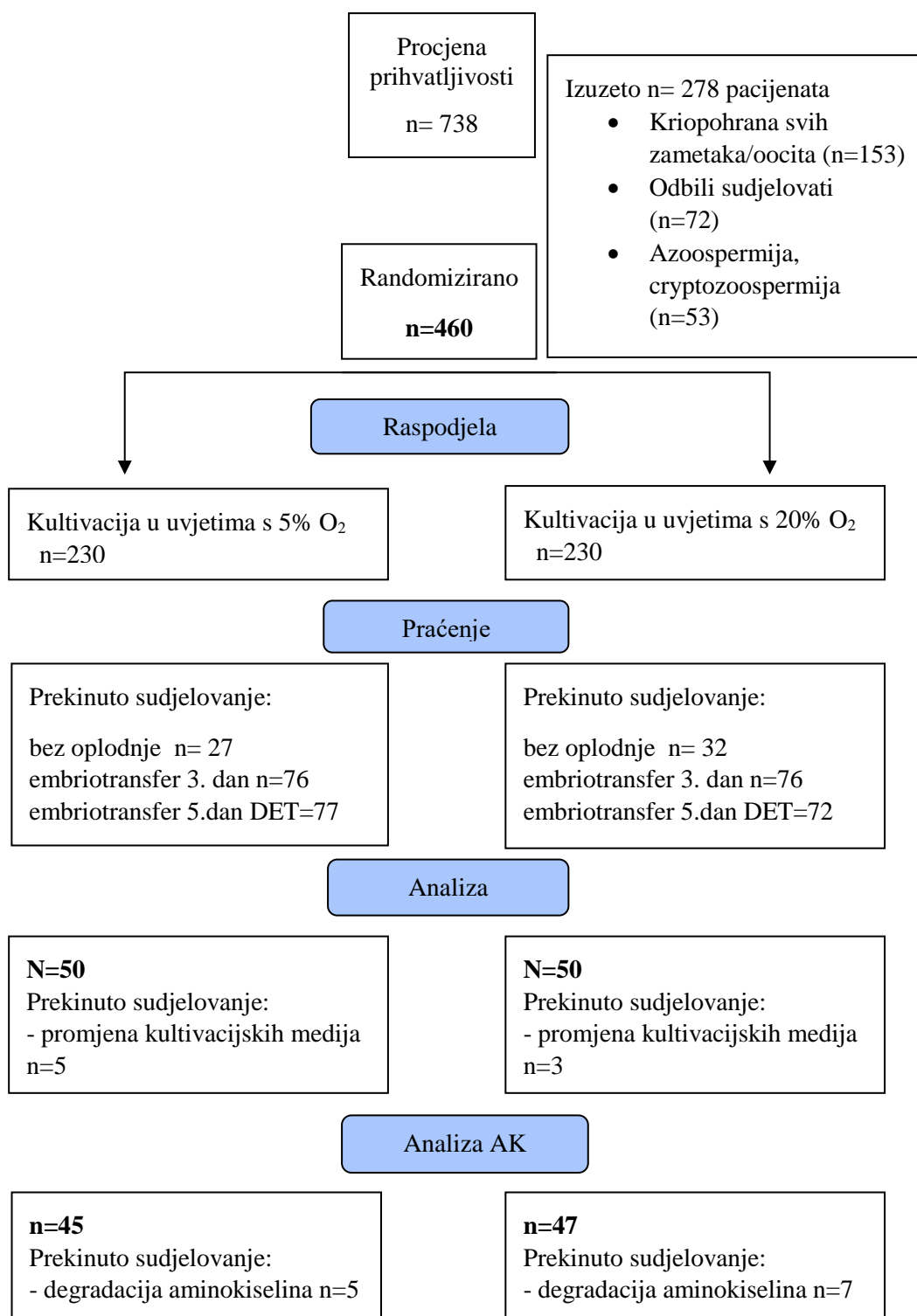
3. ISPITANICE, MATERIJALI I METODE

Istraživanje je dizajnirano poštujući pravila za prospektivne, randomizirane studije prema načelima CONSORT izjave (Schulz i sur. 2010). Studija je odobrena od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta, Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb te Etičkog povjerenstva Klinike za ženske bolesti i porode. Sve ispitanice uključene u studiju potpisale su privolu o sudjelovanju. Istraživanje se provodilo u Odjelu za kliničku embriologiju Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a od ožujka 2015. do kolovoza 2017. Analiza aminokiselina metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti udružene s tandemskom spektrometrijom masa (engl.LC-MS/MS) provodila se u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti Kliničkog Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

3.1. Ispitanice

U istraživanu skupinu smo uključili pacijentice u dobnom rasponu od 22-42 godina starosti koje su podvrgnute hormonalnoj stimulaciji jajnika i predviđene su za postupak *in vitro* fertilizacije (IVF) ili intracitoplazmatsku spermalnu injekciju (ICSI). Isključili smo pacijentice čiji suprug ima dijagnozu teške muške neplodnosti kao što je azoospermija te kriptozoospermija.

Procjenu prihvatljivosti smo izvršili na 738 bračna para od kojih je 278 izuzeto zbog kriopohrane svih oocita ili zametaka (n=153), zato što su odbili sudjelovati (n=72) ili je postavljena dijagnoza teške muške neplodnosti (n=53) (Slika 14.).



Slika 14. CONSORT dijagram (Schulz i sur. 2010).

Randomizaciju smo proveli na ukupno 460 pacijentica. Praćenje sudjelovanja morali smo prekinuti kod većeg broja pacijenatica (ukupno 360): kod kojih nije došlo do oplodnje (ukupno 59), kod kojih smo izvršili embriotransfer 3.dan (ukupno 152) ili 5.dan ali smo vratili 2 blastociste (engl. double embryo transfer – DET) (ukupno 149). Nakon svih odustajanja ostalo je 50 pacijentica kod kojih će se oplodnja i kultivacija zametaka odvijati u inkubatoru s 5% O₂ te 50 pacijentica kod kojih će se oplodnja i kultivacija zametaka odvijati u inkubatoru s 20% O₂. S obzirom da je izuzetno bitno da su zameci svih pacijentica kultivirani u istim uvjetima, u kolovozu 2017. morali smo prekinuti prikupljanje posljednjih 8 uzoraka zbog promjene kultivacijskih medija temeljem novog ugovora o jednogodišnjoj javnoj nabavi potrošnog materijala za potrebe pomognute oplodnje. U grupi kultiviranoj s 5% O₂ analizirano je 45 uzoraka pacijentica s obzirom na koncentraciju kisika dok je pri analizi aminokiselina došlo do degradacije aminokiselina kod 5 uzoraka pacijentica. U grupi kultiviranoj s 20 % O₂ analizirano je 47 uzoraka pacijentica s obzirom na koncentraciju kisika dok je pri analizi aminokiselina došlo do degradacije aminokiselina kod 7 uzoraka pacijentica (Slika 14.).

Za analizu rezultata utjecaja snižene razine kisika pacijentice smo razvrstali na 3 dobne skupine:

- A) ≤34 godine (5 O₂%: n=22, 20 O₂%: n=22)
- B) 35-39 godina (5 O₂%: n=17, 20 O₂%: n=17)
- C) ≥40 godina (5 O₂%: n=6, 20 O₂%: n=8)

Najmanji broj uzoraka prikupljen je u najstarijoj dobnoj skupini (≥40 godina). U toj dobnoj skupini su pacijentice kod kojih je ovarijska rezerva znatno smanjena te zbog smanjenog broja oocita ne dolazi do razvoja velikog broja blastocista. Kod takvih pacijentica je češće učinjen embriotransfer 2 blastociste (DET) kako bi se povećala šansa za ostvarivanje trudnoće.

Za svaku skupinu će se odrediti:

- stupanj oplodnje
- udio zametaka odlične kvalitete 3. dan
- udio odličnih blastocista 5. dan
- stupanj implantacije
- postotak trudnoća po prijenosu zametaka

Stupanj oplodnje (engl fertilization rate - FR) smo definirali kao broj oplođenih (prisutnost 2 pronukleusa na dan 1) oocita po broju inseminiranih (IVF) ili injiciranih (ICSI) oocita.

Postotak trudnoća po prijenosu zametaka (CPR) smo definirali kao broj trudnoća po embriotransferu utvrđenih na temelju pozitivnog hCG-a u serumu (> 25 IU/L 14. dan nakon embriotransfera) i ultrazvučnih (gestacijska vrećica, embrij sa pozitivnim kucajevima srca) parametara.

Stupanj implantacije (engl. implantation rate – IR) definirali smo kao broj gestacijskih vrećica utvrđenih 8 tjedana nakon embriotransfera podijeljen sa brojem transferiranih embrija.

Postotak živorođene djece (LBR) smo definirali kao broj živorođene djece po broju embriotransfera (živorođeno dijete nakon navršenog 20. tog tjedna gestacijske dobi).

U prikazivanju rezultata smo izjednačili IR s CPR s obzirom da u ostvarenim trudnoćama nismo imali biokemijskih trudnoća kao ni višeplođnih trudnoća.

Također s obzirom da se predviđeno trajanje istraživanja i obrade rezultata produžilo, smatrali smo vrijednim uvrstiti i konačan ishod trudnoća – LBR u naše rezultate.

3.2. Randomizacija

Pacijente smo raspodijelili koristeći randomizacijsku tablicu dobivenu pomoću kompjuterskog programa – <https://www.randomizer.org/>. Metodom randomizacije raspodijelili smo pacijentice u dvije skupine:

- A) Pacijentice kod kojih će se oplodnja i kultivacija odvijati u inkubatoru s 5% O₂ (n=50)
- B) Pacijentice kod kojih će se oplodnja i kultivacija odvijati u inkubatoru s 20% O₂ (n=50)

Embriolog je prije početka ciklusa pomognute oplodnje razgovarao s pacijentima te ukoliko su zadovoljili uvjete i pristali na istraživanje potpisali su Suglasnost za sudjelovanje odraslog ispitanika (Prilog 2). Pacijentima koji su pristali na istraživanje dodijeljen je redni broj s randomizacijske tablice koji određuje uvjete kultivacije (5% ili 20% O₂).

3.3. Stimulacija

Protokol kontrolirane ovarijske stimulacije započinjao je 2. ili 3. dan menstrualnog ciklusa pacijentice. Za stimulaciju ovulacije korišteni su rekombinantni folikul-stimulirajući hormoni (engl. follicle stimulating hormone - FSH) (Gonal F, Merck-Serono; ili Puregon, Merck Sharp & Dohme) ili humani menopauzalni hormoni (engl. human menopausal gonadotropin -hMG) (Menopur, Ferring) s dnevnom dozom od 150-300 internacionalnih jedinica (engl. international units - IU). Dnevna doza bila je prilagođena anamnezi pacijentice te sukladno odgovoru jajnika tijekom stimulacije. Antagonisti gonadotropin-oslobađajućeg hormona (engl. gonadotropin releasing hormone - GnRH) - cetrotelix ili ganirelix (Cetrotide, Serono; Orgalutran, Merck Sharp & Dohme) primjenjivani su od 6. dana stimulacije ovulacije sukladno fiksnom protokolu u dozi od 0,25 mg sve do dana primjene završne injekcije humanog korionskog gonadotropina (engl. human chorionic gonadotropin - hCG). Aspiracija (punkcija) folikula izvršena je 36 sati nakon primjene hCG-a (Ovitrelle, Merck Serono) u dozi od 5000 ili 10,000 IU (ovisno o broju folikula) (Slika 15).

3.4. Kultivacija zametaka

3.4.1. Aspiracija folikula (punkcija)

24 sata prije planirane aspiracije folikula pripremili smo medije za kultivaciju oocita i zametaka kako bi se pH medija stabilizirao na zadanim parametrima (6% CO₂, 37°C) koji najbolje odgovaraju fiziološkim uvjetima spolnog trakta žene. U četveroždernačne ploče u prve dvije jažice smo stavili 0,5 ml medija za fertilizaciju (ORIGIO Sequential Fert, Origio) te naslojili s 0,5 ml parafinskog ulja (ORIGIO Liquid Paraffin, Origio) kako bismo spriječili isparavanje medija. U preostale dvije jažice stavili smo 1 ml medija za fertilizaciju bez ulja za ispiranje. Za svaku pacijenticu pripremili smo dvije četveroždernačne ploče.

Na dan aspiracije folikula (0. dan kultivacije) pripremili smo posudice s centralnim bazenom (Nunc, IVF Centerwell Dish, Thermo Scientific) u koje smo dodali 1 ml medija za skupljanje jajnih stanica (Sydney IVF Gamete Buffer, Cook Medical) te ih odložili u stolni grijač (37°C) minimalno 30 minuta.

Nakon što smo pregledali dobivene uzorke folikularne tekućine, izolirali smo komplekse kumulus oocita i prebacili ih u prethodno zagrijan medij za skupljanje jajnih stanica. Nakon što smo pregledali sve uzorke, odstranili smo suvišak granulosa stanica koje okružuju COC i prebacili ih u prethodni dan pripremljenu četverozdenačnu ploču u jažicu prekrivenu uljem (Slika 15). Uzorak je potom spremljen u inkubator odgovarajuće koncentracije kisika (5% ili 20%) prema dodijeljenom rasporedu randomizacijske tablice.

Za kultivaciju s reduciranim kisikom (5%) korištena su dva MINC stolna inkubatora (Cook Medical), a za kultivaciju s 20% O₂ jedan klasični CO₂ inkubator (Heracell 240i CO₂, Thermo Scientific). MINC koristi mješavine plinova (5% O₂, 6% CO₂ i 89% N₂) dok Heracell inkubator koristi standardni atmosferski 6% CO₂ (20% O₂). Temperatura u oba inkubatora je bila 37°C i relativna vlažnost \geq 90%. Razinu CO₂ i temperaturu smo mjerili svako jutro sukladno internom standardnom operativnom postupku kontrole kvalitete. Tijekom dnevne rutine pazili smo da u isto vrijeme u klasičnom inkubatoru nemamo više od 6 uzoraka od pacijentica, odnosno u MINC-u više od 4. Prosječan broj uzoraka od pacijentica po inkubatoru bio je 3.

Svi postupci su izvedeni čistoj sobi - prostoru u kojemu filtrirani zrak ima pozitivan tlak u odnosu na okolne prostore te zrak efikasno ispire prostor (klasa D prema GMP (engl. Good Manufacturing Practice – GMP)). Prostor u kojemu su svi relevantni parametri strogo kontrolirani: temperatura (23°C), relativna vlaga, buka, osvjetljenje i ostali parametri. Svi postupci izuzev intracitoplazmatske spermalne injekcije (engl. intracytoplasmic sperm injection - ICSI) rađeni su u besprašnoj komori s grijanom pločom (37°C) u kojoj broj čestica i broj mikrobnih kolonija odgovara najmanje klasi C prema GMP. Prema GMP-u, preporučene dopuštene granice za mikrobiološku kontaminaciju za zrak izražene su kao broj kolonija (engl. colony forming unit – CFU): C klasa – 50 CFU; D klasa – 100 CFU (taložna ploča). Preporučene dopuštene granice za mikrobiološku kontaminaciju za radne površine, izražene kao broj kolonija (CFU) su : C klasa – 25 CFU; D klasa – 50 CFU (obrisak/otisak).

3.4.2. Analiza ejakulata

Nakon analize ejakulata (pokretljivost, koncentracija i građa spermija) muškog partnera odredili smo vrstu oplodnje – *in vitro* fertilizacija (IVF) ili intracitoplazmatska spermalna injekcija (ICSI). Indikacije za ICSI postupak su: < 5 milijuna spermija/ml ejakulata, < 4% spermija normalne građe, < 2 milijuna pokretnih spermija u ejakulatu ili prethodni neuspješni postupci oplodnje standardnom IVF metodom. Ejakulate smo obrađivali metodom isplivavanja (engl. swim-up metoda) kako bismo izolirali samo pokretne spermije.

Metoda isplivavanja se temelji na dva glavna koraka:

- spermiji se propiru medijem te centrifugiranjem odvajaju od sjemene tekućine
- isplivavanje progresivno pokretnih spermija iz taloga u naslojeni medij u kojem se u konačnici ukoncentriraju centrifugiranjem

Nakon analize kvalitete sjemena, uzorak smo razdijelili sterilnom špricom u dvije do tri (ovisno o volumenu uzorka) sterilne plastične epruvete volumena od 5 ml, prethodno označene imenom i prezimenom pacijenta i pacijentice te jedinstvenim identifikacijskim brojem. U epruvetu smo stavljali najviše 2,5 ml uzorka i dodali 2 ml medija za ispiranje spermija (Sydney IVF Gamete Buffer, Cook Medical) prethodno inkubiranog na 37°C. Sadržaj epruvete s uzorkom i medijem centrifugirali smo 10 minuta na 300 x g. Nakon centrifugiranja supernatant smo odijelili sterilnom špricom. Na talog smo sterilnom špricom od 2 ml dodali 0,5-1 ml medija za ispiranje spermija prethodno inkubiranog na 37°C. Epruvete s obrađenim uzorcima odložili smo u besprašnu komoru. Nakon sat vremena supernatant smo pažljivo odijelili sterilnom špricom od 2 ml i prebacili u novu sterilnu epruvetu označenu imenom i prezimenom pacijenta i pacijentice te jedinstvenim identifikacijskim brojem. Sadržaj epruvete smo potom centrifugirali 10 minuta na 300 x g. Supernatant smo pažljivo odijelili sterilnom špricom od 2 ml i talog resuspendirali u malom volumenu medija. Za oplodnju smo koristili sadržaj taloga u kojem su izolirani samo pokretni spermiji (Slika 15).

3.4.3. Oplodnja metodom *in vitro* fertilizacije (IVF)

Kada je oplodnja rađena klasičnim IVF-om komplekse kumulus oocita smo inkubirali otprilike 4 sata prije oplodnje kako bismo nezrelim jajnim stanicama omogućili period za dodatno sazrijevanje. Nakon 4 sata u jažice s jajnim stanicama (najviše 4 oocite po jažici) dodali smo progresivno pokretne spermije. Za inseminaciju je potrebno 50 000 do 100 000 progresivno pokretnih spermija po jajnoj stanici. U besprašnoj komori s grijanom pločom koristeći propipetu sa sterilnim nastavkom uzeli smo određeni volumen pokretnih spermija i pod mikroskopom inseminirali jajne stanice te ih potom odložili nazad u inkubator do ocjene fertilizacije sljedećeg dana (Slika 15).

3.4.4. Oplodnja metodom intracitoplazmatske spermalne injekcije

Kada je oplodnja rađena ICSI metodom prvo smo pripremili četverozdenačnu ploču s 0,5 ml enzima hijaluronidaze (Sydney IVF Hyaluronidase, Cook Medical) u prvoj jažici te medijem za ispiranje (Sydney IVF Gamete Buffer, Cook Medical) u preostale tri jažice (1 ml) te stavili u stolni grijač na 37°C kroz 30 min. 2 sata nakon aspiracije folikula odstranili smo (denudirali) granulosa stanice kemijskim (enzim hijaluronidaza) te mehaničkim putem (propiranje užim nastavkom mikropipetora).

Nakon čišćenja jajnih stanica procijenili smo njihovu zrelost utvrđivanjem postojanja polarnog tjelešca. Zrele jajne stanice smo odijelili za ICSI postupak. Nezrele jajne stanice te stanice u atreziji (propadanju) odstranili smo u biološki otpad.

Pripremili smo pločice u kojima ćemo raditi mikroinjekciju. U gornji dio poklopca male Petrijeve posudice (Nunc IVF ICSI Dishes, Thermo Scientific) stavili smo tri kapljice od 10 µl polivinilpirolidona (PVP Medium, Origio), jednu kapljicu od 20 µl koja se razvuče u oblik križa te šest kapljica od 10 µl medija za ispiranje. Tako pripremljene kapljice prekrili smo s 7 ml parafinskog ulja (ORIGIO Liquid Paraffin, Origio) te posudicu odložili u stolni inkubator na 37°C do izvođenja ICSI postupka. Grijaču ploču invertnog mikroskopa s mikromanipulatorima uključili smo barem pola sata ranije kako bi postigla temperaturu od 37 °C.

Mikromanipulatori mikroskopa moraju biti u centralnom položaju. Na lijevi nosač mikropipete pričvrstili smo staklenu mikropipetu za pridržavanje jajne stanice. Iz desnog nosača mikropipete istisnuli smo određenu količinu ulja kako bi se eliminirali eventualni mjehurići

zraka nakon čega smo na nosač postavili staklenu mikropipetu za intracitoplazmatsku injekciju (mikroinjekcijska pipeta) te se u nju ispustili 1 cm ulja. Pod najmanjim povećanjem mikropipete smo namjestili u centar vidnog polja u jednakoj ravnini.

Nakon inkubacije od jedan sat nakon denudacije, jajne stanice s polarnim tjelešcem stavili smo u pripremljene pločice za ICSI. U jednu od kapi PVP-a stavili smo 1-4 μ l obrađenog sjemena. Petrijevu posudicu s jajnim stanicama i spermijima stavili smo na grijanu ploču invertnog mikroskopa s mikromanipulatorima. U kapljici PVP-a s uzorkom sjemena odabrali smo odgovarajući spermij s najboljom pokretljivošću i morfologijom koji smo potom imobilizirali udarcem mikroinjekcijske pipete u predjelu vratne regije. Imobilizirani spermij aspirirali smo u mikropipetu. Pipetom za pridržavanje jajne stanice učvrstili smo jajnu stanicu na način da je polarno tjelešce na poziciji 12 ili 6 sati. Spermij smo spustili do vrha mikropipete te ga injicirali u jajnu stanicu na poziciji 3 sata.

Mikroinjekcijskom pipetom smo probili zonu pellucidu i oolemu te ušli u citoplazmu nakon čega smo aspirirali malu količinu citoplazme, a zatim injicirali spermij u jajnu stanicu. Nakon provedenog ICSI postupka jajne stanice smo prebacili u prethodno označene četverozenačne ploče te se odložili u inkubator gdje ostaju do ocjene fertilizacije sljedećeg dana (Slika 15).

3.4.5. Provjera oplodnje (1.dan kultivacije)

24 sata prije provjere oplodnje pripremili smo medije za kultivaciju oocita i zametaka kako bi se pH medija stabilizirao na zadanim parametrima (6% CO₂, 37 °C). U četverozenačne ploče u prve dvije jažice smo stavili 0,5 ml medija za diobu (ORIGIO Sequential Cleav, Origio) te naslojili s 0,5 ml parafinskog ulja (ORIGIO Liquid Paraffin, Origio). U preostale dvije jažice stavili smo 1 ml medija za diobu bez ulja za ispiranje.

Provjeru i ocjenu fertilizacije radili smo 17 \pm 1 sati nakon oplodnje jajnih stanica metodom *in vitro* fertilizacije, odnosno 16-18 sati nakon oplodnje jajnih stanica metodom intracitoplazmatske spermalne injekcije. Pravilno oplođene jajne stanice s dva pronukleusa odvojili smo i prebacili u novu četverozenačnu ploču pripremljenu prethodni dan te vratili u inkubator. Pacijente kod kojih nije došlo do oplodnje ili je postojala samo nepravilna oplodnja isključili smo iz daljnjeg istraživanja.

A) Ocjena fertilizacije nakon oplodnje jajnih stanica metodom *in vitro* fertilizacije (IVF)

U besprašnoj komori na stereo mikroskopu s grijanom pločom s jajnih stanica/zigota smo odstranili ostatke granuloza stanica mehaničkim putem pomoću užeg nastavka pipetora. Ocjenu morfologije i provjeru fertilizacije radili smo na invertnom mikroskopu s grijanom pločom pri povećanju od 200 puta.

B) Ocjena fertilizacije nakon oplodnje jajnih stanica metodom intracitoplazmatske spermalne injekcije (ICSI)

Provjeru smo izvodili na isti način kao i nakon klasičnog IVF-a samo što nismo morali odstranjivati stanice granuloze (Slika 15).

3.4.6. Provjera diobe (2. i 3. dan kultivacije)

2. dan kultivacije pripremili smo medije za kultivaciju zametaka kako bi se pH medija stabilizirao na zadanim parametrima (6% CO₂, 37°C). U velikim Petrijevim posudicama (Nunc IVF Petri Dish, 90mm, Thermo Scientific) napravili smo 4 kapljice medija za blastociste volumena 200 µl (ORIGIO Sequential Blast, Origio) te prekrili s 10 ml parafinskog ulja (ORIGIO Liquid Paraffin, Origio).

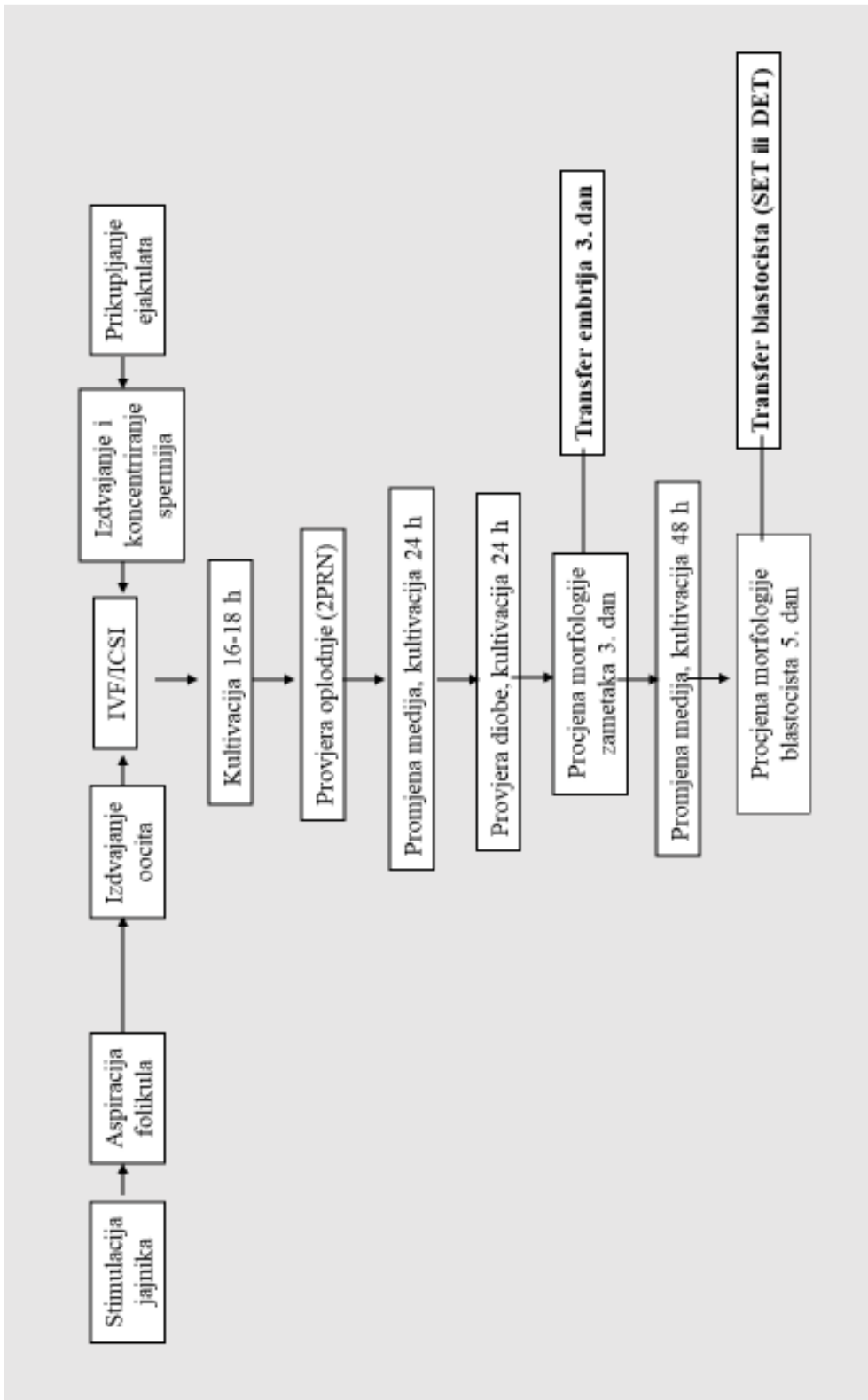
Ocjenju zametaka radili smo na invertnom mikroskopu s grijanom pločom pri povećanju od 200 puta i nakon toga četveroždnačne ploče vraćali u inkubator. Ocjenu kvalitete, diobe i morfologije zametaka radili smo prema Istambulskom konsenzusu (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011). Ako je postojala mogućnost kultiviranja zametaka do 5. dana odnosno stadija blastociste (ovisno o broju i kvaliteti zametaka) 3. dan odvojili smo 4 morfološki najbolje ocijenjena zametka i zasebno ih kultivirali u Petrijevim posudicama pripremljenim dan ranije. U slučajevima kad smo imali mali broj optimalnih zametaka ili sukladno zahtjevima pacijenata napravili smo embriotransfer 3. dan te takve pacijente isključili iz istraživanja.

Od 3. do 5. dana zametke nismo vadili iz inkubatora (Slika 15).

3.4.7. Provjera diobe (5.dan kultivacije) i embriotransfer

5. dan ocijenili smo morfologiju i kinetiku diobe blastociste (trofoektoderm, ekspanziranost blastocela i embrionalni čvorić) prema Istambulskom konsenzusu te odabrali najbolju za embriotransfer, a višak kvalitetnih blastocista kriopohranili. U slučajevima kada smo ocijenili

da nemamo niti jednu optimalnu blastocistu ili sukladno zahtjevima pacijenata napravili smo DET te takve pacijente isključili iz daljnjeg istraživanja (Slika 15).



Slika 15. Shematski prikaz postupka medicinski pomognute oplodnje

3.4.8. Priprema uzorka za analizu aminokiselina

Kapljicu medija (200 μ l) u kojem je bila pohranjena transferirana blastocista prebacili smo u ampulu za kriopohranu spermija (Nalgene Long-Term Storage Cryogenic Tubes, 1,8 ml, Thermo Scientific) te pohranili na -20°C do daljnje analize aminokiselina. Kapljicu smo izdvojili pomoću tanke iglice (BD Microlance 3) spojene na tuberkulin špricu (BD Plastipak, 1 ml) tako da smo uvukli medij pomoću iglice koju smo potom skinuli i tek tada ispustili medij u ampulu. Na taj način smo izbjegli kontaminaciju uzorka parafinskim uljem.

3.4.9. Kontrole

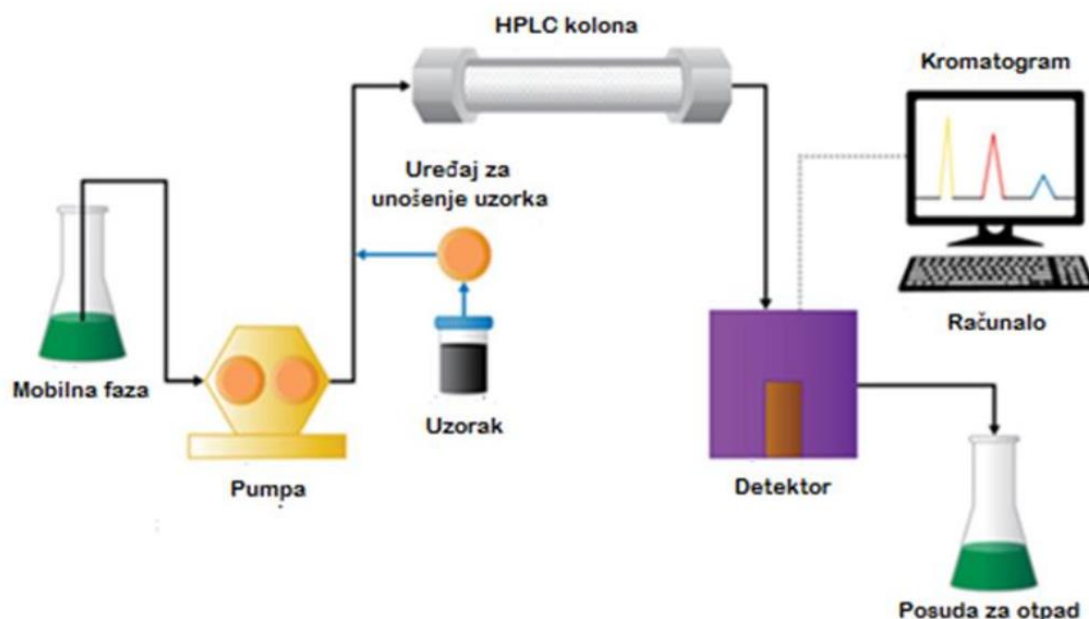
Zbog proizvođačke prakse nismo mogli dobiti točan sastav i koncentraciju aminokiselina koje sadrži medij za kulturu blastocista, sastav smo odredili analizom medija (HPLC MS/MS metodom) u kojem nisu bili kultivirani zamci. Odredili smo 19 aminokiselina koje ćemo uvrstiti u istraživanje: glicin, asparagin, serin, aspartat, treonin, glutamat, histidin, arginin, lizin, metionin, valin, tirozin, leucin, fenilalanin, norvalin, izoleucin, prolin, alanin te norleucin. Mjerene koncentracije aminokiselina cisteina, glutamina i triptofana bile su u premalim koncentracijama ($<30\mu\text{M}$) te ih nismo uvrstili u istraživanje. Ostale aminokiseline se nisu prikazale u analiziranim uzorcima. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu radi veće preciznosti dobivenih rezultata.

Kao referentni uzorak koristili smo čisti medij za kulturu blastocista (ORIGIO Sequential Blast, Origio) koji je bio kultiviran i pohranjen na isti način kao i medij u kojem je bio zametak. Testirali smo po jedan referentni uzorak od svakog LOT-a medija za kulturu blastocista korištenog u ovom istraživanju.

3.5. HPLC-MS/MS

Razdvajanje i analiza aminokiselina provedeni su kromatografijom obrnutih faza (engl. Reversed Phase - RP) na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (engl. Ultra-High-Performance Liquid Chromatograph - UHPLC) spregnute s tandemskom spektrometrijom masa (engl. Liquid Chromatography - Mass spectrometry - LC-MS/MS). LC-MS/MS uključuje tandemski spektrometar masa (uređaj API 3200™, AB SCIEX) udružen s UHPLC uređajem (UHPLC-NEXERA, Shimadzu).

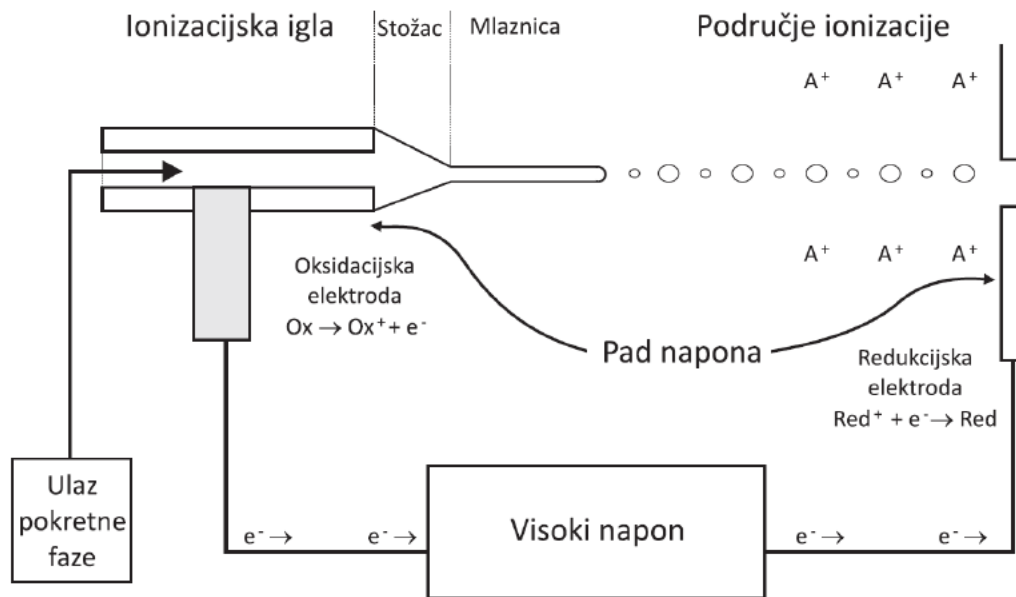
Sustav UHPLC Nexera sastoji se od sljedećih komponenti: upravljač (engl. Controller), otplinjač (engl. Degasser), spremnik za pokretnu fazu, visoko tlačna pumpa, automatski sustav za unošenje uzorka s injektorom (engl. Autosampler), kućište s grijačem (engl. Column Heater) u kojoj je smješten kromatografski stupac, detektor (UV-Vis) i računalo. Na prednjoj strani glave pumpe se nalazi i ventil za ispiranje (engl. Drain or Purge Valve) pomoću kojeg se ispiru pojedini kanali pumpe i odstranjuje zaostali zrak prisutan u sustavu (Slika 16).



Slika 16. Osnovne komponente HPLC i UHPLC sustava (Waters 2019).

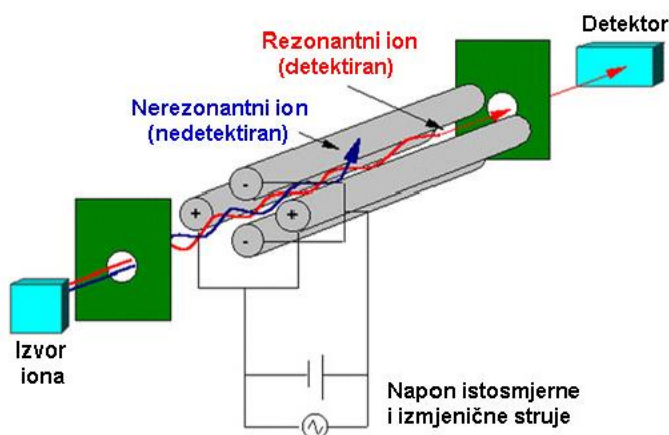
Tandemski spektrometar masa API 3200™ sastoji se od ionskog izvora, trostrukog kvadrupolnog analizatora masa, detektora i računala s dva pripadajuća softvera, Analyst®- i Cliquid®. Za pravilan rad uređaja neophodni su i generator dušika te vakuumska pumpa. Analiza spektrometrijom masa započinje uvođenjem analita u ionski izvor gdje se događa

proces ionizacija (u ovom slučaju ionizacija elektro-raspršivanjem; engl. Electrospray ionization - ESI) (Slika 17.)



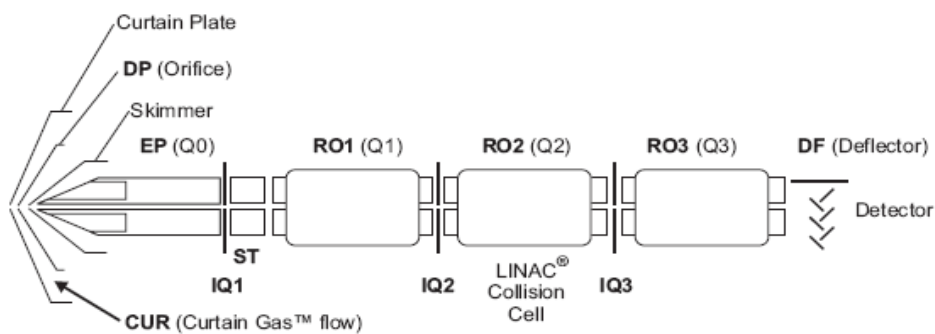
Slika 17. Shematski prikaz ESI ionizacije (Cindric i sur. 2009)

Potom nastali ioni putuju u analizator masa gdje se razdvajaju prema m/z (eng. Mass-to-charge ratio) vrijednostima, te u konačnici dolaze do detektora koji registrira broj iona pri svakoj vrijednosti m/z . U slučaju masenog spektrometra (MS) - model API 3200, uređaj ima niz kvadrupolnih filtera koji propuštaju ione sukladno njihovom omjeru mase i naboja (m/z) (Slika 18.)



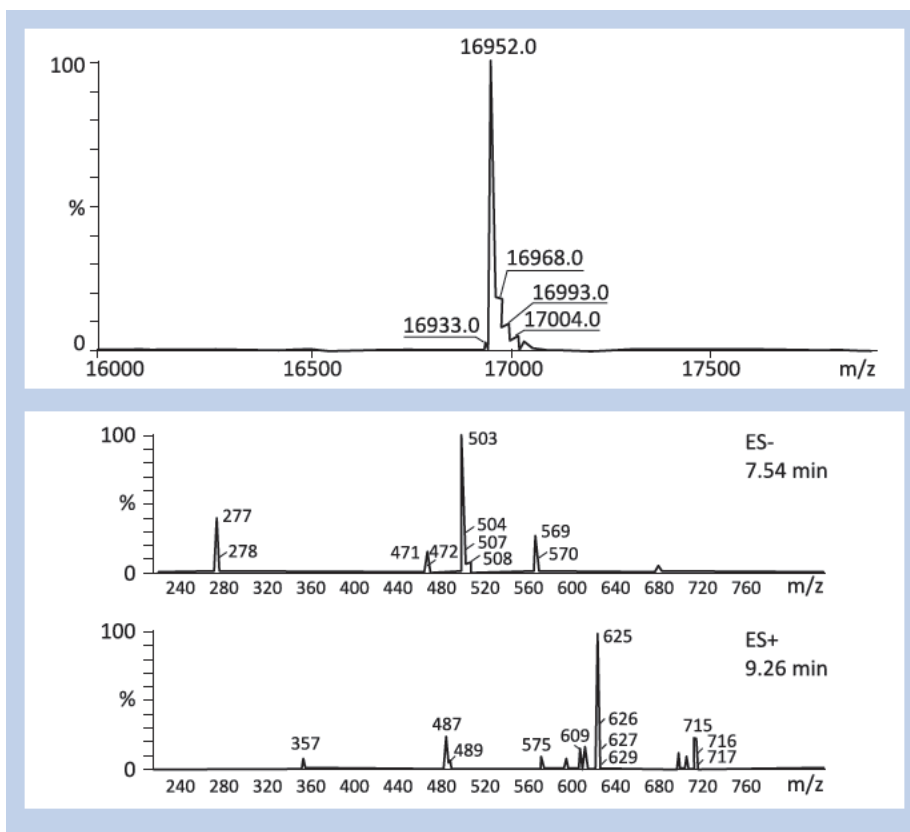
Slika 18. Shematski prikaz kvadrupolnog analizatora masa (Dodig, 2016).

Ioni koji ulaze u ionski put najprije se fokusiraju pomoću Q0 prije prolaza u Q1. Q1 je filtrirajući kvadrupol koji sortira (filtrira) ione prije nego prijeđu na Q2, kolizijsku ćeliju, u kojoj se ioni dodatno fragmentiraju. Za stvaranje iona produkata u eksperimentima tandemne spektrometrije masa najčešće se koristi kolizijom inducirana disocijacija (engl. Collision Induced Dissociation - CID) koja se odvija u kolizijskoj ćeliji spektrometra masa u međusobnoj interakciji iona prekursora ili u interakciji iona prekursora s propuštenim inernim plinom (argon, dušik, zrak i sl.). Nakon prolaza kroz Q2, ioni ulaze u Q3 gdje se dodatno filtriraju te potom dolaze do detektora (Slika 19.).



Slika 19. Optički put iona (Sciex, 2010)

U detektoru se ulazni impulsi pretvaraju u signal. Signal predstavlja intenzitet iona za određeni m/z , a skup takvih signala uređaj prikazuje kao spektar masa (Slika 20).



Slika 20. Kontinuirani i centroidni prikaz spektra masa. (Cindric i sur. 2009)

3.5.1. Priprema uzoraka

Analiza i razdvajanje smjese aminokiselina provedeni su korištenjem certificiranog aTRAQ™ kit-a koji omogućuje istovremenu detekciju i kvantifikaciju 45 aminokiselina u biološkim uzorcima (Sciex, Framingham, MA, USA). Kit za analizu aminokiselina aTRAQ™ u sebi sadrži interni standard za svaku aminokiselinu od interesa i na taj način omogućuje preciznu i ponovljivu detekciju te kvantifikaciju. Kit aTRAQ™ pokriva dinamični raspon limita kvantifikacije između LLOQ (eng. Lower Limit of Quantitation) do ULOQ (eng. Upper Limit of Quantitation) od 10,000 μM (Tablica 6). Uzorci pacijenata pripremljeni su prema aTRAQ™ protokolu proizvođača namijenjenom za primjenu na LC-MS/MS kromatografskim sustavima.

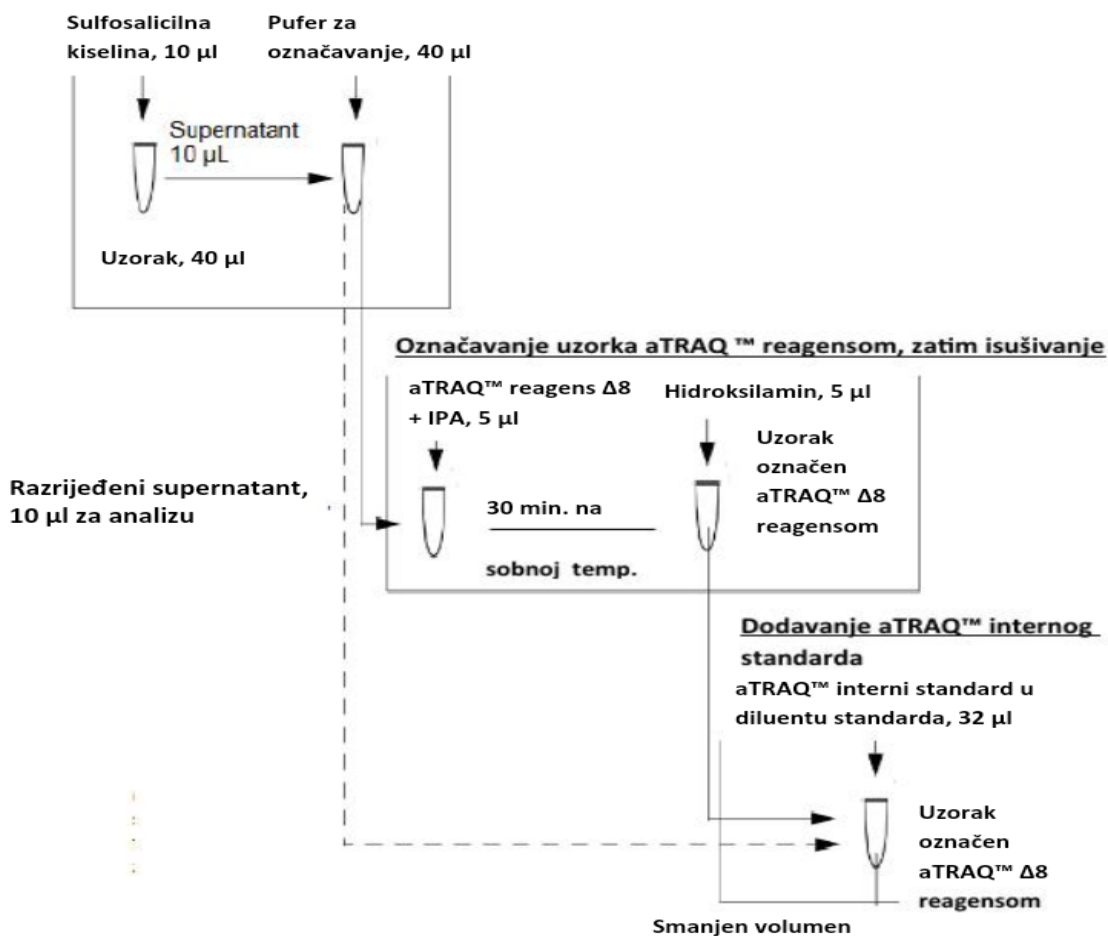
Na očišćeni radni stol, koristeći nitrilne rukavice izvadili smo sve aTRAQ reagense (Tablica 6.) prisutne u kit-u i odložili na poseban stalak, osim internog standarda. Svi reagensi su po potrebi izmiješani na vorteks mješalici (BioSun). U malim Eppendorf epruvetama (Eppendorf) pomiješali smo 40 μl uzorka s komercijalnim kontrolnim uzorcima plazme (ClinChek Plasma Controls for Amino Acids, Recipe Chemicals + Instruments GmbH) te smo u svaku epruvetu

dodali sulfosalicinu kiselinu (sadrži otprilike 4000 pmol norleucina) za deproteinizaciju. Kratko smo ih izmiješali na vorteks mješalici te zatim centrifugirali (mikrocentrifuga Eppendorf 5415 R) na 16 000 okretaja u minuti u trajanju od 2 minute. Supernatant smo prebacili u čistu epruvetu i dodali pufer za označavanje (eng. Labeling Buffer) koji sadrži otprilike 800 pmol norvalina. Nakon kratkog miješanja na vorteks mješalici i centrifugiranja supernatant smo prebacili u čistu epruvetu i dodali 5 µl aTRAQ reagensa za označavanje uzoraka. Uzorke smo inkubirali 30 minuta na sobnoj temperaturi te nakon toga dodali hidroksilamin kako bismo izbjegli djelomično označavanje fenola na aminokiselini tirozin i uklonili nevezani aTRAQ reagens. Uzorke smo ponovo inkubirali na sobnoj temperaturi 15 minuta. Dodali smo 32 µl internog standarda koji sadrži mješavinu označenih aminokiselina. Točna koncentracija aminokiselina u internom standardu je točno određena od strane proizvođača za svaki LOT i zabilježena na Certifikatu analize za svaku seriju. Obilježili smo flomasterom pojedine volumene na epruvetama i uparili pod strujom dušika (VLM GmbH) do pola volumena (10 minuta). U sve uzorke dodali smo oko 25 µl ultra čiste vode (LiChrosolv, LC-MS grade, Merck). Prebacili smo uzorke u prethodno pripremljene staklene viala za kromatografsku analizu (Slika 21).

Tablica 6. Sadržaj kit-a aTRAQ™

| Naziv reagensa | Količina | Kratki opis |
|-------------------------|------------------|---|
| aTRAQ™ | 4 bočice, 1,8 ml | Za 15 analiza |
| Reagens Δ8 | | |
| Sulfosalicilna kiselina | 1 bočica, 1,8 ml | 10% sulfosalicilna kiselina za precipitaciju proteina iz uzorka |
| Pufer za označavanje | 2 bočice, 1,8 ml | 20 µM norvalina, pH 8,5 |
| Hidroksilamin | 1 bočica, 1,8 ml | 1,2% otopina hidroksilamina |
| Modifikator A | 2 bočice, 1,8 ml | 100% mravlja kiselina (formijat) |
| Modifikator B | 2 bočice, 200µl | 100% heptafluorobutirična kiselina |
| Izopropanol | 1 bočica, 1,8 ml | Za pripremu aTRAQ™ reagensa |

Taloženje uzoraka i razrjeđivanje



Slika 21. Postupak pripreme uzoraka za analizu i razdvajanje smjese aminokiselina (Sciex, 2010).

3.5.2. Kromatografska separacija

Pripremljeni uzorci su dodani u staklene vialne (1,5 ml) s polipropilenskim umecima volumena 250 µl (Agilent Technologies) te postavljeni u automatski sustav za unošenje uzoraka s injektorom (engl. Autosampler). Razdvajanje aminokiselina u analiziranim uzorcima provedeno je kromatografijom obrnutih faza na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (engl. Reverse Phase –High Performance Liquid Chromatography - RP-HPLC). Detaljni kromatografski parametri dani su u Tablici 7.

Tablica 7. Kromatografski parametri za razdvajanje smjese aminokiselina tekućinskom kromatografijom obrnutih faza

| | | | |
|--------------------------------------|---|--------------------------|--------------------------|
| Kromatografski stupac | Amino Acid Analyzer AAA C18, 4.6 x 150 mm; 5 µm (Sciex) | | |
| Pokretna faza A | Vodena otopina (LiChrosolv LC-MS grade, Merck) s dodatkom 0,1% mravlje kiseline i 0,01% heptafluorbutične kiseline kao modifikatorima | | |
| Pokretna faza B | Otopina metanola (LiChrosolv LC-MS hypergrade, Merck) s dodatkom 0,1% mravlje kiseline i 0,01% heptafluorbutične kiseline kao modifikatorima. | | |
| Prikaz promjene gradijenta u vremenu | Vrijeme/min | % pokretne faze A | % pokretne faze B |
| | 0,0 | 98,0 | 2,0 |
| | 6,0 | 60,0 | 40,0 |
| | 10,0 | 60,0 | 40,0 |
| | 11,0 | 10,0 | 90,0 |
| | 12,0 | 10,0 | 90,0 |
| | 13,0 | 98,0 | 2,0 |
| | 18,0 | 98,0 | 2,0 |
| Volumen injektiranja uzoraka | 2,0 µl | | |
| Protok pokretne faze | 0,8 ml/min | | |
| Trajanje analize | 18 min | | |
| Detekcija | Uzorci su analizirani HPLC-MS/MS pristupom (vidi tekst u nastavku) | | |
| Temperatura kromatografskog stupca | 50°C | | |
| Interni standard | aTRAQ™ interni standard | | |

Koristili smo kromatografski stupac Amino Acid Analyzer (AAA) C18 proizvođača Sciex, veličina čestica punila od 5 μm , veličina kromatografskog stupca od 150 mm i 4,6 mm unutarnjeg promjera. Kromatografski stupac je održavan na temperaturi od 50°C, a na kromatografski stupac nanoseno je 2,0 μl uzorka obilježenih s TRAQ reagensima. Razdvajanje i elucija aminokiselina provedeni su gradijentnom elucijom (Tablica 7), korištenjem smjese različitih omjera pokretnih faza A i B. Pokretna faza A je po sastavu vodena otopina (LiChrosolv LC-MS grade, Merck) s dodatkom 0,1% mravlje kiseline i 0,01% heptafluorbutične kiseline kao modifikatorima, dok je pokretna faza B otopina metanola (LiChrosolv LC-MS hypergrade, Merck) s dodatkom 0,1% mravlje kiseline i 0,01% heptafluorbutične kiseline kao modifikatorima. Pripremili smo 300 ml mobilne faze A i B.

Razdvajanje i elucija provedeni su uz nepromijenjen protok pokretne faze od 0,8 ml/min uz trajanje analize po uzorku od 18 minuta.

3.5.3. Analiza aminokiselina tehnikom spektrometrije masa

Test prikladnosti sustava (engl. System Suitability test - SST) proveden je uvijek prije puštanja analitičkog slijeda, jednom dnevno. Ispitivanje prikladnosti sustava je dio pripreme analitičkog sustava te potvrđuje da cijeli sustav (UHPLC-MS/MS) ispravno radi. Test također potvrđuje retencijska vremena i razinu osjetljivosti za MS sustav. Ispitivanje prikladnosti sustava provodi se koristeći aTRAQ™ interni standard kao uzorak. Ispitivanje prikladnosti sustava traje otprilike 30 minuta do stabilizacije retencijskih vremena od interesa.

Nakon kromatografskog razdvajanja aminokiselina uzorci su ionizirani elektro-raspršivanjem (ESI) samo u pozitivnom načinu rada spektrometra masa. Parametri ionskog izvora bili su sljedeći: curtain gas (N_2), 20 psi; napon ionizacijskog raspršivanja, 4500 V; temperatura, 600°C; GS1, nebulizacijski plin (N_2), 50 psi; GS2, heater gas, 50 psi; kolizijski plin (N_2), 6 psi.

Ekperiment je proveden višestrukim praćenjem reakcija (engl. Multiple Reaction Monitoring - MRM), prilikom kojih je svaka aminokiselina (uključujući njezin odgovarajući unutarnji standard) okarakterizirana specifičnim prijelazima mase kvadrupola Q1 i Q3 te specifičnim tranzicijskim parametrima (Tablica 8). Ulazni i izlazi potencijal kolizijske ćelije postavljeni su na 10V i 3V za svaki pojedini analit. Kolizijska energija i declustering potencijal postavljeni su na 30V za sve aminokiseline osim ornitina, lizina i njihovih odgovarajućih unutarnjih

standarda, koji su postavljeni na 50V. Nakon ulaska u kvadrupole masenog spektrometra, prekursorski ioni su fragmentirani u kolizijskoj ćeliji i dobiveni fragmenti iona prekursora (ioni produkti) su filtrirani prema vrijednosti m/z te detektirani.

3.5.4. Pregled rezultata

Dvije komercijalno dostupne aplikacije, Analyst®, verzija 1.5.2 i Cliquid®, verzija 3.2 (Sciex) korištene su za prikupljanje, obradu podataka te kvantifikaciju do 45 aminokiselina po uzorku. Koncentracije pojedinačnih aminokiselina su automatski izračunate usporedbom površine vrška analita od interesa (D8-označene aminokiseline) i površine odgovarajućeg internog standarda (D0-obilježene aminokiseline). Retencijska vremena D8- i D0-obilježenih vršaka su ista, budući da su to identične aminokiseline, samo s različitim brojem izotopa.

3.6. Statistička analiza

Priprema podataka izvršena je pomoću programskog paketa Microsoft Office Excel. Podaci su prikazani tablično i grafički. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kontinuiranih numeričkih vrijednosti te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Kategorijske i nominalne vrijednosti su prikazane kroz odgovarajuće frekvencije i udjele. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz medijane i interkvartilne raspone, a razlike između ispitivanih skupina koncentracije kisika analizirane su Mann-Whitneyjevim U testom te prikazane Box i Whiskerovom plotu unutar kojeg su prikazane vrijednosti medijana, interkvartilnih raspona, minimalnih i maksimalnih vrijednosti te ekstremnih vrijednosti koje se od medijana razlikuju za više od 3 interkvartilna raspona. Razlike u kategorijskim varijablama analizirane su χ^2 - testom, odnosno Fisherovim egzaktnim testom u slučajevima kada je broj ispitanika po ćeliji bio manji od 10. P vrijednosti manje od 0,05 ($P < 0,05$) su smatrane značajnima. U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 25.0 (<https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>).

4. REZULTATI

Usporedbom osnovnih značajki ispitanica u dvije ispitivane skupine – sa sniženom koncentracijom kisika (5% O₂) i povišenom koncentracijom kisika (20% O₂), pokazali smo da nema statistički značajnih razlika u glavnim parametrima kao što je raspodjela dobnih skupina, uzroku neplodnosti (poznati ili idiopatski), metodi oplodnje (IVF ili ICSI) (Tablica 8.), indeksu tjelesne mase (engl. body mass index – BMI), broju dobivenih oocita te količini primijenjenih internacionalnih jedinica gonadotropina (IU) (Tablica 9. i 10.). U obje ispitivane skupine u većini slučajeva uzrok neplodnosti je bio poznat (88,9% u 5% odnosno 80,9% u 20%). Također smo u obje ispitivane skupine podjednako koristili obje metode oplodnje (IVF/ICSI). Medijan broja oocita u skupini s 5% kisika bio je 8,00 (6,00-12,00) dok je u skupini s 20% kisika bio 10,00 (7,00-12,00).

Tablica 8. Dob ispitanica i njihovi osnovni klinički i embriološki parametri

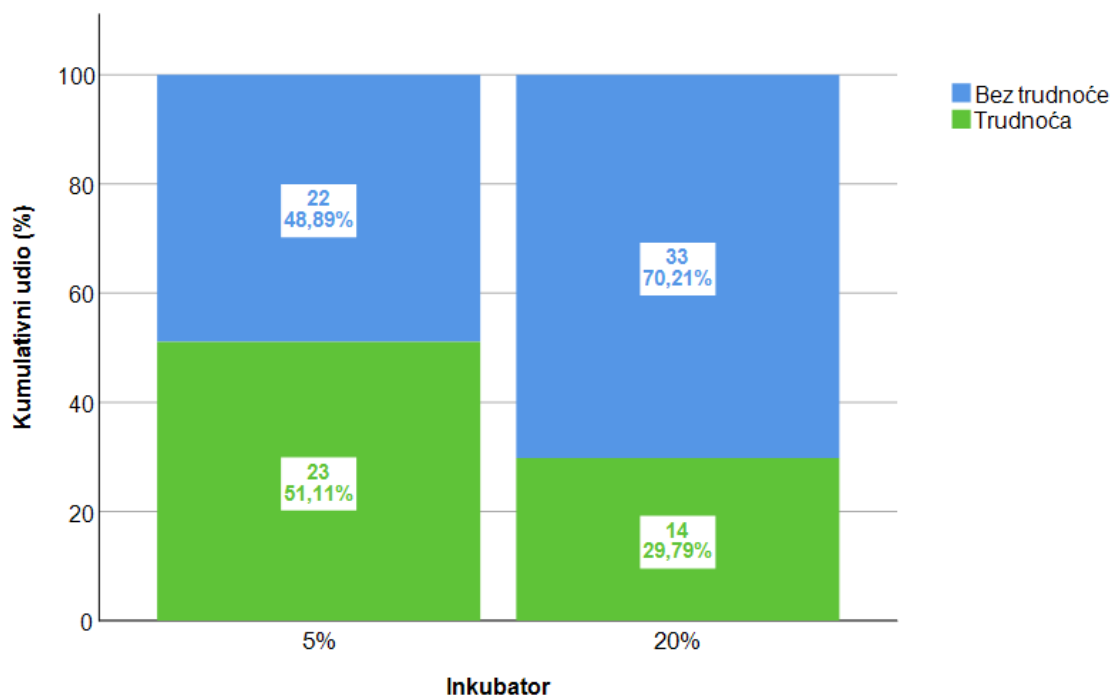
| | | Koncentracija kisika u inkubatoru | | | | P vrijednost (< 0,05)* |
|-----------------------|--------------|-----------------------------------|-------|-------------|-------|--|
| | | 5% N=45 | | 20% N=47 | | |
| | | N | % | N | % | |
| Dobne skupine | ≤34 godine | 22 | 48,9% | 22 | 46,8% | 0,920 |
| | 35-39 godina | 17 | 37,8% | 17 | 36,2% | |
| | ≥40 godina | 6 | 13,3% | 8 | 17,0% | |
| Uzrok neplodnosti | Poznati | 40 | 88,9% | 38 | 80,9% | 0,386 |
| | Idiopatski | 5 | 11,1% | 9 | 19,1% | |
| Metoda oplodnje | ICSI | 21 | 46,7% | 22 | 46,8% | 1,000 |
| | IVF | 24 | 53,3% | 25 | 53,2% | |
| Kvaliteta blastociste | 1 (odlična) | 38 | 84,4% | 36 | 76,6% | 0,677 |
| | 2 (srednja) | 5 | 11,1% | 7 | 14,9% | |
| | 3 (loša) | 2 | 4,4% | 4 | 8,5% | |
| Ishodi trudnoća | Bez trudnoće | 22 | 48,9% | 33 | 70,2% | 0,037* |
| | Trudnoća | 23 | 51,1% | 14 | 29,8% | |
| Živorodena djeca | Ne | 10 | 22,2% | 3 | 6,4% | 0,288 |
| | Da | 13 | 28,9% | 11 | 23,4% | |

ICSI – intracitoplazmatska spermalna injekcija; IVF – *in vitro* fertilizacija

4.1. Morfološka procjena kvalitete zametaka

4.1.1. Klinički parametri

Postotak trudnoća po prijenosu zametaka (CPR) značajno je povećan u skupini zametaka koji su kultivirani sa sniženom koncentracijom kisika – 51,1% u odnosu na 29,8%, $P=0,037$ (Tablica 8., Slika 22.).

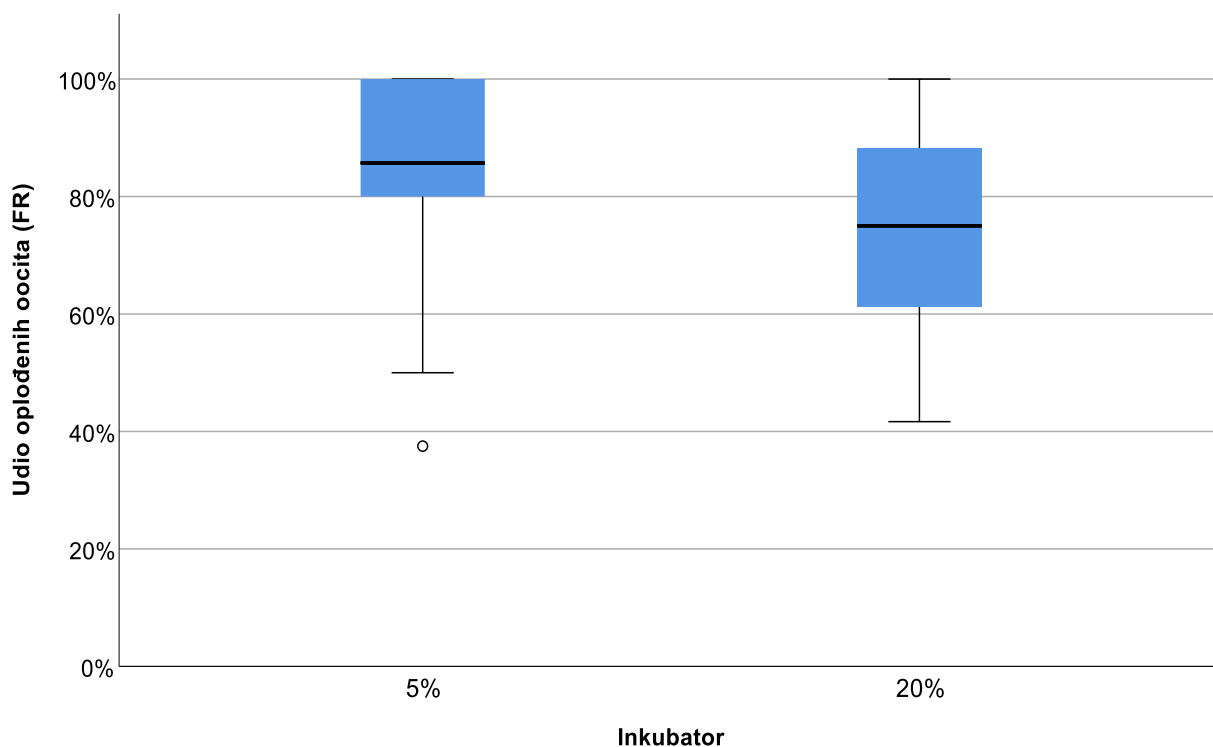


Slika 22. Utjecaj kultivacije zametaka s različitim koncentracijama kisika (5% i 20%) na postotak trudnoća po prijenosu zametaka (CPR)

Kod postotka živorođene djece (LBR) nismo dokazali superiornost kultivacije sa sniženom razinom kisika (28,9% u odnosu 23,4%, $P=0,288$) (Tablica 8.).

4.1.2. Embriološki parametri

Statistički značajno veći stupanj oplodnje ($P=0,004$) utvrdili smo u uvjetima inkubacije sa 5% O_2 (85,7% medijan, 78,9 - 100% interkvartilni raspon) u odnosu na 20% O_2 (75% medijan, 60,0% - 88,9% interkvartilni raspon) (Slika 23, Tablica 9 i 10).

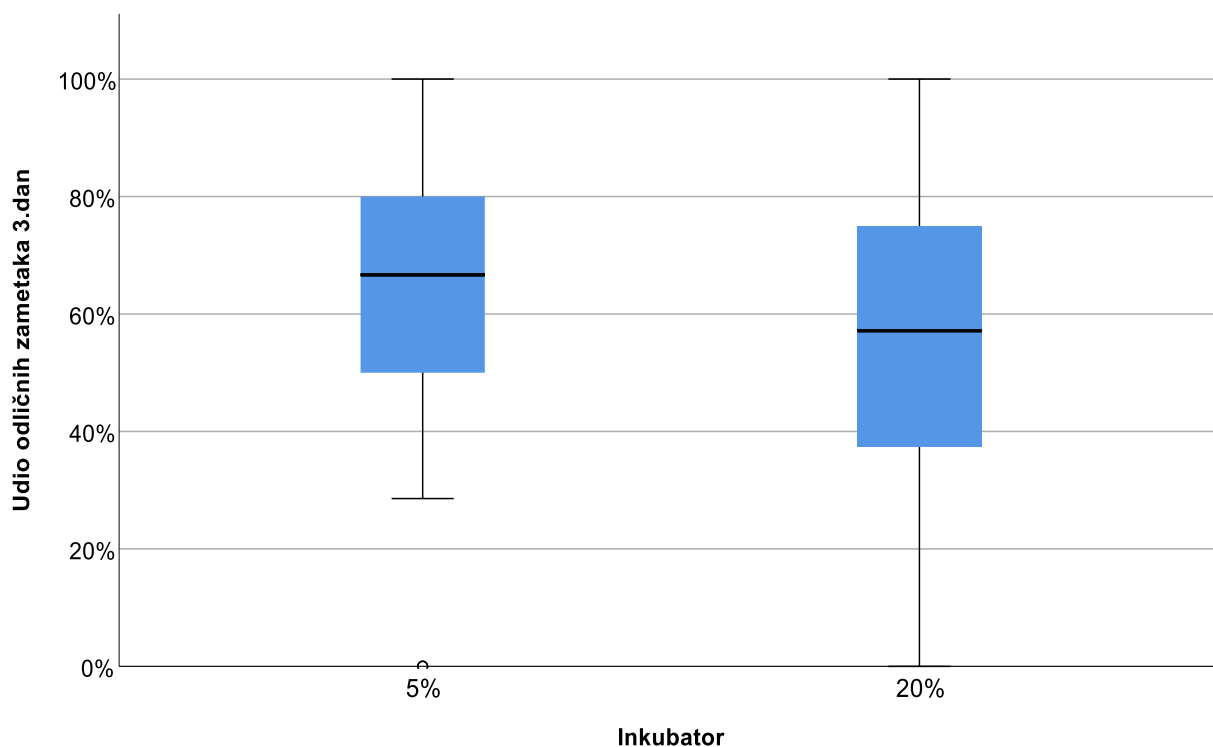


Slika 23. Utjecaj kultivacije zametaka s različitim koncentracijama kisika (5% i 20%) na stupanj oplodnje (udio oplodjenih oocita). Box plot predstavlja interkvartilni raspon (gornja granica – 75 centila, donja granica – 25 centila), linija u sredini box plot predstavlja medijan. Gornja crta predstavlja max.vrijednost, a donja min.vrijednost. Kružić predstavlja stršeću vrijednost.

Broj oocita u postupku (broj oocita stavljenih na oplodnju) nije se značajno razlikovao među ispitivanim skupinama ($P=0,240$) kao ni broj oplodjenih oocita ($P=0,662$).

Broj zametaka 3.dan je također bio podjednak ($P=0,865$) kao i broj odličnih zametaka 3.dan ($P=0,157$).

Udio odličnih zametaka 3.dan statistički je značajno bio veći ($P=0,048$) u skupini kultiviranoj sa 5% O_2 (66,7% medijan, 50,00% - 80,00% interkvartilni raspon) u usporedbi sa zamecima kultiviranim s 20% O_2 (57,1% medijan, 37,5% - 75,00% interkvartilni raspon) (Slika 24).



Slika 24. Utjecaj kultivacije zametaka s različitim koncentracijama kisika (5% i 20%) na udio odličnih zametaka 3.dan. Box plot predstavlja interkvartilni raspon (gornja granica – 75 centila, donja granica – 25 centila), linija u sredini box plot predstavlja medijan. Gornja crta predstavlja max. vrijednost, a donja min.vrijednost. Kružić predstavlja stršeću vrijednost.

Broj blastocista 5. dan, broj odličnih blastocista 5. dan te udio odličnih blastocista 5. dan nije se značajno razlikovao ($P=0,280$; $P=0,082$; $P=0,080$) iako smo zabilježili bolje rezultate u skupini sa sniženom koncentracijom kisika.

Kada smo blastociste razdijelili prema kvaliteti (1=odlična, 2=srednja, 3=loša) također nismo utvrdili značajnu razliku ($P=0,677$) između ispitivanih skupina (Tablica 8.) iako smo zabilježili veći broj kvalitetnih blastocista u skupini s 5% O_2 (Tablica 9 i 10).

Tablica 9. Indeks tjelesne težine ispitanica i njihovi embriološki parametri

| Koncentracija kisika u inkubatoru | N | Min | Max | Centile | | | |
|------------------------------------|-----|-----|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | | | 25. | Medijan | 75. | |
| BMI (kg/m ²) | 5% | 45 | 18,00 | 28,40 | 20,40 | 22,50 | 23,85 |
| | 20% | 47 | 19,50 | 34,50 | 21,20 | 22,10 | 24,60 |
| Broj oocita dobivenih stimulacijom | 5% | 45 | 3,00 | 16,00 | 6,00 | 8,00 | 12,00 |
| | 20% | 47 | 1,00 | 27,00 | 7,00 | 10,00 | 12,00 |
| IU gonadotropina | 5% | 45 | 1125,00 | 2750,00 | 1575,00 | 1725,00 | 2062,50 |
| | 20% | 47 | 900,00 | 3000,00 | 1350,00 | 1650,00 | 1950,00 |
| Broj oocita u postupku | 5% | 45 | 3,00 | 12,00 | 5,00 | 8,00 | 11,00 |
| | 20% | 47 | 1,00 | 12,00 | 6,00 | 9,00 | 12,00 |
| Broj oplodjenih oocita | 5% | 45 | 3,00 | 12,00 | 4,00 | 6,00 | 9,00 |
| | 20% | 47 | 1,00 | 12,00 | 4,00 | 6,00 | 8,00 |
| Udio oplodjenih oocita | 5% | 45 | 37,5% | 100,0% | 78,9% | 85,7% | 100,0% |
| | 20% | 47 | 41,7% | 100,0% | 60,0% | 75,0% | 88,9% |
| Broj zametaka 3. dan | 5% | 45 | 3,00 | 12,00 | 4,00 | 5,00 | 8,50 |
| | 20% | 47 | 1,00 | 12,00 | 4,00 | 6,00 | 7,00 |
| Broj odličnih zametaka 3. dan | 5% | 45 | 0,00 | 9,00 | 2,00 | 4,00 | 5,50 |
| | 20% | 47 | 0,00 | 9,00 | 2,00 | 3,00 | 5,00 |
| Udio odličnih zametaka 3. dan | 5% | 45 | 0,0% | 100,0% | 50,0% | 66,7% | 80,0% |
| | 20% | 47 | 0,0% | 100,0% | 37,5% | 57,1% | 75,0% |
| Broj blastocista 3. dan | 5% | 45 | 1,00 | 8,00 | 2,00 | 3,00 | 4,00 |
| | 20% | 47 | 1,00 | 5,00 | 1,00 | 3,00 | 3,00 |
| Broj odličnih blastocista 5. dan | 5% | 45 | 0,00 | 8,00 | 1,00 | 2,00 | 3,00 |
| | 20% | 47 | 0,00 | 4,00 | 1,00 | 1,00 | 3,00 |
| Udio odličnih blastocista 5. dan | 5% | 45 | 0,0% | 100,0% | 38,1% | 66,7% | 100,0% |
| | 20% | 47 | 0,0% | 100,0% | 33,3% | 50,0% | 100,0% |

BMI-indeks tjelesne težine; IU-internacionalne jedinice.

Tablica 10. Indeks tjelesne težine ispitanica i njihovi embriološki parametri – P vrijednosti

| | Mann-Whitney U | Z | P (< 0,05)* |
|--------------------------------------|-----------------------|----------|-----------------------|
| BMI (kg/m ²) | 959,000 | -0,770 | 0,442 |
| Br. oocita | 892,500 | -1,293 | 0,196 |
| IU gonadotropina | 879,500 | -1,394 | 0,163 |
| Broj oocita u postupku | 908,500 | -1,175 | 0,240 |
| Broj oplođenih oocita | 1002,000 | -0,437 | 0,662 |
| Udio oplođenih oocita | 689,000 | -2,919 | 0,004* |
| Broj zametaka 3. dan | 1036,000 | -0,169 | 0,865 |
| Broj odličnih zametaka 3. dan | 878,500 | -1,415 | 0,157 |
| Udio odličnih zametaka 3. dan | 805,500 | -1,976 | 0,048* |
| Broj blastocista 3. dan | 924,500 | -1,080 | 0,280 |
| Broj odličnih blastocista 5. dan | 840,000 | -1,742 | 0,082 |
| Udio odličnih blastocista 5. dan | 839,500 | -1,748 | 0,080 |

BMI-indeks tjelesne težine; IU-internacionalne jedinice.

Kod odlično ocijenjenih blastocista, neovisno o načinu kultivacije (ukupno 74), 33 je rezultiralo trudnoćom (44,6%), dok u skupini koje nisu bile ocijenjene odličnima samo 4 je rezultiralo trudnoćom (22,2%). Iako razlika nije statistički značajna (P=0,110) odlično ocijenjene blastociste su bile povezane s dvostruko većim udjelom trudnoća u odnosu na ostale (OR=2,01, 95% CI, 0,815-4,95) (engl. odds ratio - omjer izgleda) (engl. confidence interval – interval pouzdanosti)).

4.1.3. Klinički i embriološki parametri s obzirom na dobne skupine

Kada smo ispitanice raspodijelili u tri dobne skupine (≤ 34 ; 35-39; ≥ 40) također nije nađena statistički značajna razlika u kliničkim trudnoćama po prijenosu zametaka, postotku živorođene djece, udjelu odličnih zametaka 3. dan te udjelu odličnih blastocista 5. dan između dvije ispitivane skupine iako su svi rezultati bolji u skupini kultiviranoj sa sniženom koncentracijom kisika (Tablica 11., 12. i 13.).

Statistički značajnu razliku u udjelu oplođenih oocita kultiviranih sa sniženom razinom kisika utvrdili smo samo u najmlađoj dobnoj skupini ($P=0,008$) – 88,2% (81,8% - 100,00%, interkvartilni raspon) u odnosu na 76,4% (65,00% - 88,1%, interkvartilni raspon) (Tablica 13.).

U ostalim dobnim skupinama rezultati su također bolji u skupini kultiviranoj sa sniženom koncentracijom kisika ali nisu statistički značajni.

Tablica 11. Klinički i embriološki parametri s obzirom na dobne skupine

| | | Dobne skupine | | | | | | | | | | | |
|-------------------|--------------|---------------|-------|-----|-------|--------------|-------|-----|-------|------------|-------|-----|-------|
| | | ≤34 godine | | | | 35-39 godina | | | | ≥40 godina | | | |
| | | 5% | | 20% | | 5% | | 20% | | 5% | | 20% | |
| | | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Uzrok neplodnosti | Poznati | 20 | 90,9% | 18 | 81,8% | 15 | 88,2% | 14 | 82,4% | 5 | 83,3% | 6 | 75,0% |
| | Idiopatski | 2 | 9,1% | 4 | 18,2% | 2 | 11,8% | 3 | 17,6% | 1 | 16,7% | 2 | 25,0% |
| IVF/ICSI | ICSI | 9 | 40,9% | 10 | 45,5% | 9 | 52,9% | 10 | 58,8% | 3 | 50,0% | 2 | 25,0% |
| | IVF | 13 | 59,1% | 12 | 54,5% | 8 | 47,1% | 7 | 41,2% | 3 | 50,0% | 6 | 75,0% |
| Blastocista | 1 (odlična) | 19 | 86,4% | 17 | 77,3% | 16 | 94,1% | 14 | 82,4% | 3 | 50,0% | 5 | 62,5% |
| | 2 (srednja) | 3 | 13,6% | 4 | 18,2% | 1 | 5,9% | 1 | 5,9% | 1 | 16,7% | 2 | 25,0% |
| | 3 (loša) | 0 | 0,0% | 1 | 4,5% | 0 | 0,0% | 2 | 11,8% | 2 | 33,3% | 1 | 12,5% |
| Ishodi trudnoća | Bez trudnoće | 11 | 50,0% | 15 | 68,2% | 7 | 41,2% | 11 | 64,7% | 4 | 66,7% | 7 | 87,5% |
| | Trudnoća | 11 | 50,0% | 7 | 31,8% | 10 | 58,8% | 6 | 35,3% | 2 | 33,3% | 1 | 12,5% |
| Živorodena djeca | Ne | 5 | 22,7% | 2 | 9,1% | 4 | 23,5% | 1 | 5,9% | 1 | 16,6% | 0 | 0% |
| | Da | 6 | 27,3% | 5 | 22,7% | 6 | 35,3% | 5 | 29,4% | 1 | 16,6% | 1 | 12,5% |

ICSI – intracitoplazmatska spermalna injekcija; IVF – *in vitro* fertilizacija

Tablica 12. Klinički i embriološki parametri s obzirom na dobne skupine – P vrijednosti

| P vrijednosti (< 0,05) Fisherov test* | Dobne skupine | | |
|--|---------------|--------------|------------|
| | ≤34 godine | 35-39 godina | ≥40 godina |
| Uzrok neplodnosti | 0,664 | 1,000 | 1,000 |
| IVF/ICSI | 1,000 | 1,000 | 0,580 |
| Broj blastocista | 0,698 | 0,734 | 0,790 |
| CPR | 0,358 | 0,303 | 0,538 |
| LBR | 0,637 | 0,588 | 1,000 |

*Razlike između skupina udjela kisika

ICSI – intracitoplazmatska spermalna injekcija; IVF – *in vitro* fertilizacija; CPR – postotak trudnoća po prijenosu zametaka; LBR – postotak živorođene djece

Tablica 13. Usporedba embrioloških i kliničkih parametara s obzirom na dobne skupine

| Dobne skupine | Koncentracija kisika u inkubatoru | | N | Min | Max | Centile | | | P (< 0,05)* |
|---------------|-----------------------------------|-----|----|-------|--------|---------|---------|--------|-------------|
| | | | | | | 25. | Medijan | 75. | |
| ≤ 34 godine | FR | 5% | 22 | 37,5% | 100,0% | 81,8% | 88,2% | 100,0% | 0,008* |
| | | 20% | 22 | 41,7% | 100,0% | 65,0% | 76,4% | 88,1% | |
| | Udio odličnih zametaka 3. dan | 5% | 22 | 0,0% | 100,0% | 48,2% | 66,7% | 80,0% | 0,437 |
| | | 20% | 22 | 0,0% | 100,0% | 35,3% | 57,1% | 77,1% | |
| | Udio odličnih blastocista 5.dan | 5% | 22 | 0,0% | 100,0% | 48,2% | 80,0% | 100,0% | 0,159 |
| | | 20% | 22 | 0,0% | 100,0% | 25,0% | 60,0% | 100,0% | |
| 35-39 godina | FR | 5% | 17 | 50,0% | 100,0% | 73,2% | 80,0% | 100,0% | 0,374 |
| | | 20% | 17 | 41,7% | 100,0% | 60,0% | 71,4% | 94,4% | |
| | Udio odličnih zametaka 3. dan | 5% | 17 | 0,0% | 100,0% | 50,0% | 75,0% | 90,0% | 0,211 |
| | | 20% | 17 | 0,0% | 100,0% | 31,3% | 60,0% | 80,0% | |
| | Udio odličnih blastocista 5. dan | 5% | 17 | 0,0% | 100,0% | 41,7% | 66,7% | 100,0% | 0,209 |
| | | 20% | 17 | 0,0% | 100,0% | 33,3% | 50,0% | 100,0% | |
| ≥ 40 godina | FR | 5% | 6 | 75,0% | 100,0% | 77,1% | 90,0% | 100,0% | 0,098 |
| | | 20% | 8 | 60,0% | 100,0% | 60,6% | 69,0% | 95,0% | |
| | Udio odličnih zametaka 3. dan | 5% | 6 | 42,9% | 100,0% | 48,2% | 66,7% | 100,0% | 0,119 |
| | | 20% | 8 | 16,7% | 75,0% | 35,0% | 46,4% | 71,3% | |
| | Udio odličnih blastocista 5. dan | 5% | 6 | 0,0% | 100,0% | 0,0% | 50,0% | 100,0% | 0,946 |
| | | 20% | 8 | 0,0% | 100,0% | 0,0% | 46,7% | 100,0% | |

FR – stupanj oplodnje

4.2. Procjena kvalitete zametaka analizom aminokiselina

U slučaju rezultata koji je jednak 1,00 - obrtaj aminokiselina je bio identičan kao u podlozi, sve iznad 1,00 znači da su se aminokiseline izlučivale u podlogu dok sve manje od 1,00 znači da su se aminokiseline trošile iz podloge.

4.2.1. Usporedna procjena metabolizma svih zametaka

Usporedbom vrijednosti obrtaja pojedinih aminokiselina u odnosu na referentnu podlogu između ispitivanih skupina s 5%-tnim (N=40) i 20%-tnim (N=40) udjelom kisika Mann-Whitney- U testom ustvrdili smo da nema značajne razlike u metabolizmu aminokiselina transferiranih zametaka (Tablica 14.).

4.2.2. Usporedna procjena metabolizma zametaka koji su rezultirali trudnoćom

Usporedbe vrijednosti obrtaja pojedinih aminokiselina u odnosu na referentnu podlogu između uspješnih i neuspješnih trudnoća za skupinu s 5%-tnim udjelom kisika Mann-Whitney U testom pokazale su značajnu razliku u obrtaju aminokiseline arginin (Tablica 15.).

Udio arginina bio je manji od 1 (0,86) (0,77-0,94) u odnosu na skupinu bez trudnoća gdje je omjer bio značajno veći (0,97) (0,89-1,09) $P=0,016$.

Usporedbe vrijednosti obrtaja pojedinih aminokiselina u odnosu na referentnu podlogu između uspješnih i neuspješnih trudnoća za skupinu s 20%-tnim udjelom kisika Mann-Whitney U testom pokazale su značajnu razliku u obrtaju aminokiseline metionin ($P=0,036$). Metionin je najnestabilnija aminokiselina koja pokazuje varijabilne rezultate i u internim standardima te se ovaj rezultat treba zanemariti (Tablica 16.).

4.2.3. Usporedna procjena metabolizma zametaka sa najboljom morfološkom ocjenom

Usporedbe vrijednosti obrtaja pojedinih aminokiselina u odnosu na referentnu podlogu između loših i odličnih blastocista za skupinu s 5%-tnim udjelom kisika Mann-Whitney U testom pokazale su značajnu razliku u obrtaju aminokiseline norvalin.

Udio norvalina bio je manji od 1 (0,99) (0,87-1,07) u odnosu na loše blastociste gdje je omjer bio značajno veći (1,14) (1,03-1,17) $P=0,011$ (Tablica 17., Slika 25).

Usporedbe vrijednosti obrtaja pojedinih aminokiselina u odnosu na referentnu podlogu između loših i odličnih blastocista za skupinu s 20%-tnim udjelom kisika Mann-Whitney U testom pokazale su značajnu razliku u obrtaju aminokiselina: serin, histidin, arginin, lizin, tirozin, fenilalanin (Tablica 18., Slika 26).

Udio serina kod odličnih blastocista bio je veći od 1 (1,05) (0,91-1,15) u odnosu na loše blastociste gdje je omjer bio značajno manji (0,94) (0,75-1,02) $P=0,029$.

Udio histidina kod odličnih blastocista bio je manji od 1 (0,96) (0,85-1,02) u odnosu na loše blastociste gdje je omjer bio značajno manji (0,78) (0,66-0,94) $P=0,036$.

Udio arginina kod odličnih blastocista je bio je manji od 1 (0,92) (0,84-1,02) u odnosu na loše blastociste gdje je omjer bio značajno manji (0,81) (0,65-0,89) $P=0,006$.

Udio lizina kod odličnih blastocista bio je veći od 1 (1,02) (0,92-1,11) u odnosu na loše blastociste gdje je omjer bio značajno manji (0,84) (0,82-0,95) $P=0,012$.

Udio tirozina kod odličnih blastocista bio je veći od 1 (1,05) (0,98-1,12) u odnosu na loše blastociste gdje je omjer bio značajno manji (0,96) (0,79-1,06) $P=0,034$.

Udio fenilalanina kod odličnih blastocista bio je veći od 1 (1,00) (0,96-1,07) u odnosu na loše blastociste gdje je omjer bio značajno manji (0,90) (0,86-0,94) $P=0,001$.

Tablica 14. Vrijednosti obrtaja pojedinih aminokiselina u odnosu na referentnu podlogu između ispitivanih skupina inkubatora s 5% i 20% udjelom kisika: Mann-Whitney U test

| AK | % O ₂ | N | Min | Max | Centile | | | P ($< 0,05$)* |
|-----------|------------------|----|------|------|---------|---------|------|--------------------|
| | | | | | 25. | Medijan | 75. | |
| Gly omjer | 5% | 40 | 0,38 | 1,21 | 0,89 | 1,03 | 1,10 | 0,433 |
| | 20% | 40 | 0,31 | 1,14 | 0,90 | 1,02 | 1,06 | |
| Asn omjer | 5% | 40 | 0,36 | 1,36 | 0,89 | 1,00 | 1,11 | 0,954 |
| | 20% | 40 | 0,23 | 1,33 | 0,84 | 1,00 | 1,14 | |
| Ser omjer | 5% | 40 | 0,50 | 1,33 | 0,88 | 1,05 | 1,13 | 0,600 |
| | 20% | 40 | 0,50 | 1,27 | 0,89 | 1,02 | 1,12 | |
| Asp omjer | 5% | 40 | 0,57 | 1,28 | 0,93 | 1,06 | 1,16 | 0,580 |
| | 20% | 40 | 0,57 | 1,46 | 0,90 | 1,03 | 1,15 | |
| Thr omjer | 5% | 40 | 0,50 | 1,51 | 1,04 | 1,15 | 1,26 | 0,836 |
| | 20% | 40 | 0,50 | 1,56 | 0,92 | 1,11 | 1,32 | |
| Ala omjer | 5% | 40 | 0,45 | 1,63 | 0,77 | 0,90 | 1,17 | 0,427 |
| | 20% | 40 | 0,45 | 1,59 | 0,86 | 0,99 | 1,14 | |
| Glu omjer | 5% | 40 | 0,56 | 1,45 | 0,95 | 1,04 | 1,18 | 0,430 |
| | 20% | 40 | 0,56 | 1,34 | 0,91 | 1,01 | 1,15 | |
| His omjer | 5% | 40 | 0,42 | 1,26 | 0,89 | 0,97 | 1,06 | 0,127 |
| | 20% | 40 | 0,42 | 1,19 | 0,78 | 0,93 | 1,00 | |
| Arg omjer | 5% | 40 | 0,45 | 1,46 | 0,83 | 0,93 | 1,05 | 0,233 |
| | 20% | 40 | 0,45 | 1,27 | 0,81 | 0,91 | 0,97 | |
| Pro omjer | 5% | 40 | 0,53 | 1,60 | 0,90 | 1,12 | 1,23 | 0,817 |
| | 20% | 40 | 0,53 | 1,56 | 0,87 | 1,08 | 1,23 | |
| Lys omjer | 5% | 40 | 0,39 | 1,24 | 0,89 | 1,05 | 1,16 | 0,137 |
| | 20% | 40 | 0,39 | 1,19 | 0,83 | 0,99 | 1,10 | |
| Met omjer | 5% | 40 | 0,50 | 6,75 | 0,79 | 0,97 | 1,48 | 0,522 |
| | 20% | 40 | 0,50 | 5,81 | 0,69 | 0,89 | 1,54 | |
| Val omjer | 5% | 40 | 0,63 | 1,35 | 0,92 | 1,07 | 1,17 | 0,336 |
| | 20% | 40 | 0,63 | 1,30 | 0,90 | 1,03 | 1,14 | |
| Nva omjer | 5% | 40 | 0,63 | 1,22 | 0,88 | 1,01 | 1,08 | 0,121 |
| | 20% | 40 | 0,71 | 1,62 | 0,82 | 0,92 | 1,05 | |
| Tyr omjer | 5% | 40 | 0,47 | 1,59 | 0,97 | 1,04 | 1,17 | 0,538 |
| | 20% | 40 | 0,47 | 1,33 | 0,97 | 1,04 | 1,11 | |
| Ile omjer | 5% | 40 | 0,37 | 1,28 | 0,91 | 1,06 | 1,14 | 0,427 |
| | 20% | 40 | 0,37 | 1,94 | 0,86 | 1,01 | 1,14 | |
| Leu omjer | 5% | 40 | 0,38 | 1,29 | 0,96 | 1,08 | 1,15 | 0,535 |
| | 20% | 40 | 0,38 | 1,95 | 0,88 | 1,01 | 1,16 | |
| Nle omjer | 5% | 40 | 0,52 | 2,33 | 0,99 | 1,19 | 1,43 | 0,900 |
| | 20% | 40 | 0,49 | 4,20 | 0,97 | 1,25 | 1,42 | |
| Phe omjer | 5% | 40 | 0,49 | 1,27 | 0,92 | 1,01 | 1,08 | 0,336 |
| | 20% | 40 | 0,49 | 1,29 | 0,92 | 0,98 | 1,05 | |

N – broj uzoraka u ispitivanoj skupini; AK – aminokiseline; Ala alanin, Arg arginin, Asn asparagin, Asp aspartat, Cys cistein, Gln glutamin, Glu glutamat, Gly glicin, His histidin, Ile izoleucin, Lys lizin, Leu leucin, Met metionin, Nle norleucin, Nva norvalin, Phe fenilalanin, Pro prolin, Ser serin, Thr treonin, Tyr tirozin, Trp triptofan, Val valin.

Tablica 15. Vrijednosti obrtaja pojedinih aminokiselina u odnosu na referentnu podlogu između uspješnih i neuspješnih trudnoća za skupinu inkubatora s 5% udjelom kisika: Mann-Whitney U test

| AK | CPR (5% O ₂) | N | Min | Max | Centile | | | P ($< 0,05$)* |
|-----------|--------------------------|----|------|------|---------|---------|------|--------------------|
| | | | | | 25. | Medijan | 75. | |
| Gly omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,38 | 1,19 | 0,94 | 1,04 | 1,11 | 0,725 |
| | Trudnoća | 20 | 0,42 | 1,21 | 0,86 | 1,02 | 1,10 | |
| Asn omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,36 | 1,36 | 0,94 | 1,01 | 1,14 | 0,168 |
| | Trudnoća | 20 | 0,37 | 1,20 | 0,83 | 0,97 | 1,04 | |
| Ser omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,67 | 1,33 | 0,89 | 1,02 | 1,10 | 0,534 |
| | Trudnoća | 20 | 0,50 | 1,24 | 0,88 | 1,10 | 1,13 | |
| Asp omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,75 | 1,28 | 0,92 | 1,06 | 1,19 | 0,829 |
| | Trudnoća | 20 | 0,57 | 1,28 | 0,94 | 1,05 | 1,15 | |
| Thr omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,51 | 1,51 | 1,04 | 1,11 | 1,31 | 0,957 |
| | Trudnoća | 20 | 0,50 | 1,32 | 1,05 | 1,17 | 1,24 | |
| Ala omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,66 | 1,42 | 0,76 | 0,96 | 1,23 | 0,402 |
| | Trudnoća | 20 | 0,45 | 1,63 | 0,77 | 0,84 | 1,15 | |
| Glu omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,65 | 1,24 | 0,94 | 1,05 | 1,19 | 0,829 |
| | Trudnoća | 20 | 0,56 | 1,45 | 0,95 | 1,03 | 1,16 | |
| His omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,71 | 1,24 | 0,85 | 0,99 | 1,08 | 0,978 |
| | Trudnoća | 20 | 0,42 | 1,26 | 0,91 | 0,95 | 1,03 | |
| Arg omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,55 | 1,41 | 0,89 | 0,97 | 1,09 | 0,016* |
| | Trudnoća | 20 | 0,45 | 1,46 | 0,77 | 0,86 | 0,94 | |
| Pro omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,73 | 1,43 | 0,88 | 1,07 | 1,24 | 0,914 |
| | Trudnoća | 20 | 0,53 | 1,60 | 0,97 | 1,12 | 1,22 | |
| Lys omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,60 | 1,23 | 0,89 | 1,03 | 1,16 | 0,787 |
| | Trudnoća | 20 | 0,39 | 1,24 | 0,88 | 1,08 | 1,15 | |
| Met omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,58 | 6,75 | 0,78 | 1,00 | 1,94 | 0,402 |
| | Trudnoća | 20 | 0,50 | 3,45 | 0,79 | 0,90 | 1,36 | |
| Val omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,77 | 1,35 | 0,99 | 1,10 | 1,17 | 0,935 |
| | Trudnoća | 20 | 0,63 | 1,27 | 0,87 | 1,05 | 1,17 | |
| Nva omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,63 | 1,22 | 0,86 | 0,99 | 1,08 | 0,417 |
| | Trudnoća | 20 | 0,68 | 1,22 | 0,91 | 1,03 | 1,12 | |
| Tyr omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,63 | 1,39 | 0,99 | 1,05 | 1,18 | 0,298 |
| | Trudnoća | 20 | 0,47 | 1,59 | 0,91 | 1,03 | 1,15 | |
| Ile omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,80 | 1,28 | 0,91 | 1,03 | 1,14 | 0,665 |
| | Trudnoća | 20 | 0,37 | 1,22 | 0,92 | 1,08 | 1,14 | |
| Leu omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,82 | 1,29 | 0,96 | 1,09 | 1,16 | 0,589 |
| | Trudnoća | 20 | 0,38 | 1,23 | 0,90 | 1,07 | 1,15 | |
| Nle omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,74 | 1,56 | 1,02 | 1,10 | 1,44 | 0,552 |
| | Trudnoća | 20 | 0,52 | 2,33 | 0,82 | 1,27 | 1,42 | |
| Phe omjer | Bez trudnoće | 20 | 0,56 | 1,21 | 0,99 | 1,03 | 1,08 | 0,114 |
| | Trudnoća | 20 | 0,49 | 1,27 | 0,87 | 0,97 | 1,06 | |

N – broj uzoraka u ispitivanoj skupini; AK – aminokiseline; CPR – postotak kliničkih trudnoća po prijenosu zametaka; Ala alanin, Arg arginin, Asn asparagin, Asp aspartat, Cys cistein, Gln glutamin, Glu glutamat, Gly glicin, His histidin, Ile izoleucin, Lys lizin, Leu leucin, Met metionin, Nle norleucin, Nva norvalin, Phe fenilalanin, Pro prolin, Ser serin, Thr treonin, Tyr tirozin, Trp triptofan, Val valin.

Tablica 16. Vrijednosti obrtaja pojedinih aminokiselina u odnosu na referentnu podlogu između uspješnih i neuspješnih trudnoća za skupinu inkubatora s 20% udjelom kisika: Mann-Whitney U test

| AK | CPR (20% O ₂) | N | Min | Max | Centile | | | P (<0,05)* |
|-----------|---------------------------|----|------|------|---------|---------|------|------------|
| | | | | | 25. | Medijan | 75. | |
| Gly omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,31 | 1,13 | 0,90 | 1,04 | 1,06 | 0,675 |
| | Trudnoća | 13 | 0,86 | 1,14 | 0,93 | 1,01 | 1,09 | |
| Asn omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,23 | 1,26 | 0,83 | 0,96 | 1,14 | 0,516 |
| | Trudnoća | 13 | 0,75 | 1,33 | 0,91 | 1,00 | 1,15 | |
| Ser omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,50 | 1,20 | 0,89 | 1,01 | 1,12 | 0,919 |
| | Trudnoća | 13 | 0,81 | 1,27 | 0,87 | 1,03 | 1,13 | |
| Asp omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,57 | 1,46 | 0,90 | 1,03 | 1,17 | 0,654 |
| | Trudnoća | 13 | 0,67 | 1,39 | 0,87 | 0,97 | 1,14 | |
| Thr omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,50 | 1,56 | 0,91 | 1,11 | 1,35 | 0,718 |
| | Trudnoća | 13 | 0,76 | 1,38 | 0,92 | 1,12 | 1,27 | |
| Ala omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,45 | 1,41 | 0,79 | 0,97 | 1,16 | 0,394 |
| | Trudnoća | 13 | 0,84 | 1,59 | 0,88 | 1,01 | 1,16 | |
| Glu omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,56 | 1,28 | 0,92 | 1,02 | 1,17 | 0,697 |
| | Trudnoća | 13 | 0,77 | 1,34 | 0,88 | 0,99 | 1,16 | |
| His omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,42 | 1,19 | 0,75 | 0,93 | 1,00 | 0,851 |
| | Trudnoća | 13 | 0,68 | 1,17 | 0,79 | 0,91 | 1,02 | |
| Arg omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,45 | 1,15 | 0,81 | 0,91 | 0,97 | 0,573 |
| | Trudnoća | 13 | 0,72 | 1,27 | 0,82 | 0,91 | 1,03 | |
| Pro omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,53 | 1,43 | 0,94 | 1,09 | 1,26 | 0,516 |
| | Trudnoća | 13 | 0,61 | 1,56 | 0,80 | 1,04 | 1,22 | |
| Lys omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,39 | 1,19 | 0,83 | 1,00 | 1,10 | 0,874 |
| | Trudnoća | 13 | 0,77 | 1,13 | 0,85 | 0,97 | 1,09 | |
| Met omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,50 | 5,81 | 0,68 | 0,82 | 1,36 | 0,036* |
| | Trudnoća | 13 | 0,65 | 3,41 | 0,80 | 1,56 | 3,07 | |
| Val omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,63 | 1,19 | 0,91 | 1,03 | 1,14 | 0,829 |
| | Trudnoća | 13 | 0,82 | 1,30 | 0,88 | 1,02 | 1,18 | |
| Nva omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,71 | 1,62 | 0,82 | 0,93 | 1,05 | 0,718 |
| | Trudnoća | 13 | 0,75 | 1,17 | 0,82 | 0,91 | 1,05 | |
| Tyr omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,47 | 1,22 | 0,96 | 1,03 | 1,08 | 0,116 |
| | Trudnoća | 13 | 0,86 | 1,33 | 0,99 | 1,08 | 1,19 | |
| Ile omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,37 | 1,94 | 0,86 | 1,01 | 1,14 | 0,942 |
| | Trudnoća | 13 | 0,81 | 1,53 | 0,86 | 0,98 | 1,13 | |
| Leu omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,38 | 1,95 | 0,88 | 1,03 | 1,16 | 0,784 |
| | Trudnoća | 13 | 0,77 | 1,47 | 0,90 | 0,97 | 1,19 | |
| Nle omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,49 | 4,20 | 0,97 | 1,29 | 1,42 | 0,977 |
| | Trudnoća | 13 | 0,67 | 2,16 | 0,98 | 1,23 | 1,43 | |
| Phe omjer | Bez trudnoće | 27 | 0,49 | 1,11 | 0,89 | 0,98 | 1,03 | 0,363 |
| | Trudnoća | 13 | 0,81 | 1,29 | 0,93 | 0,99 | 1,08 | |

N – broj uzoraka u ispitivanoj skupini; AK – aminokiseline; CPR – postotak kliničkih trudnoća po prijenosu zametaka; Ala alanin, Arg arginin, Asn asparagin, Asp aspartat, Cys cistein, Gln glutamin, Glu glutamat, Gly glicin, His histidin, Ile izoleucin, Lys lizin, Leu leucin, Met metionin, Nle norleucin, Nva norvalin, Phe fenilalanin, Pro prolin, Ser serin, Thr treonin, Tyr tirozin, Trp triptofan, Val valin

Tablica 17. Vrijednosti obrtaja pojedinih aminokiselina u odnosu na referentnu podlogu između loših i odličnih blastocista za skupinu inkubatora s 5% udjelom kisika: Mann-Whitney U test

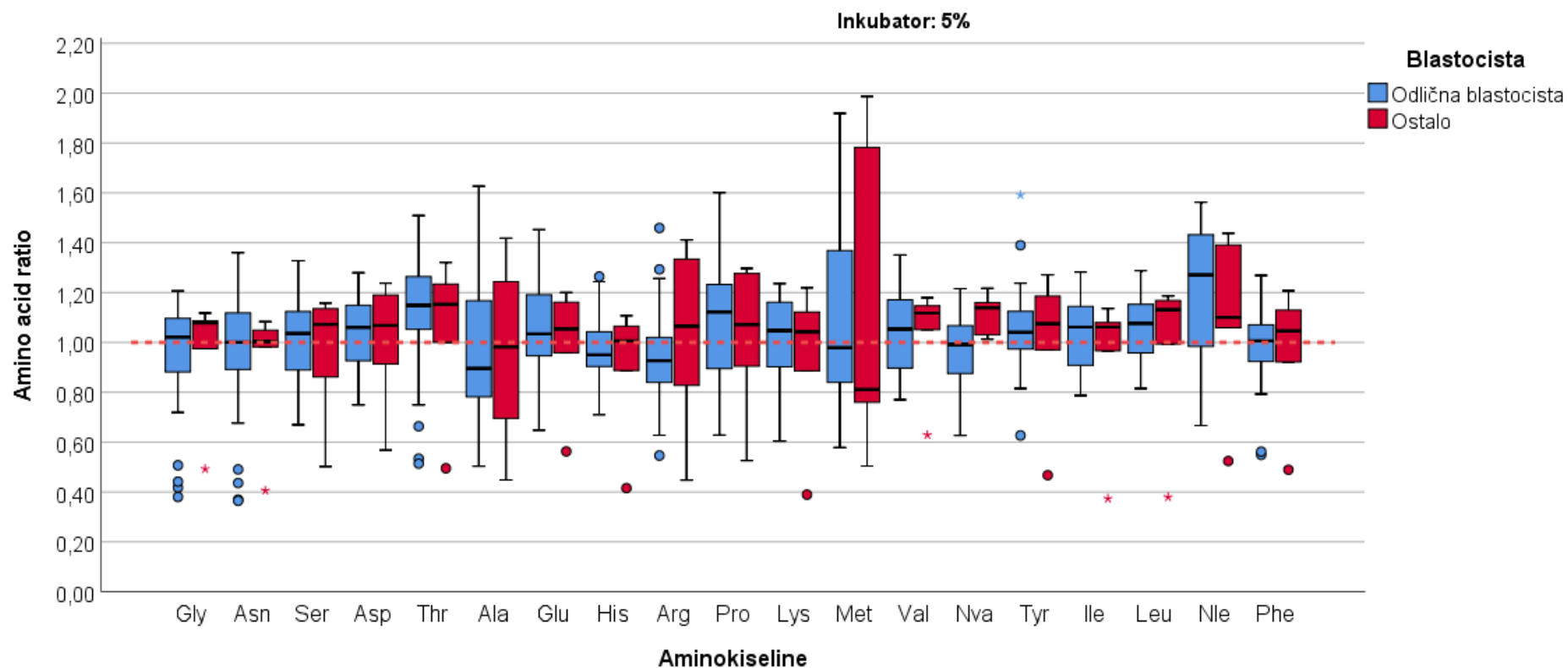
| AK | Tip blastociste (5% O ₂) | N | Min | Max | Centile | | | P (< 0,05)* |
|-----------|--------------------------------------|----|------|------|---------|---------|------|-------------|
| | | | | | 25. | Medijan | 75. | |
| Gly omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,38 | 1,21 | 0,88 | 1,02 | 1,10 | 0,677 |
| | Ostalo | 6 | 0,49 | 1,12 | 0,85 | 1,08 | 1,09 | |
| Asn omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,36 | 1,36 | 0,88 | 1,00 | 1,12 | 0,940 |
| | Ostalo | 6 | 0,41 | 1,08 | 0,84 | 1,00 | 1,06 | |
| Ser omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,67 | 1,33 | 0,89 | 1,04 | 1,13 | 0,999 |
| | Ostalo | 6 | 0,50 | 1,16 | 0,77 | 1,07 | 1,14 | |
| Asp omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,75 | 1,28 | 0,93 | 1,06 | 1,15 | 0,970 |
| | Ostalo | 6 | 0,57 | 1,24 | 0,83 | 1,07 | 1,20 | |
| Thr omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,51 | 1,51 | 1,05 | 1,15 | 1,27 | 0,733 |
| | Ostalo | 6 | 0,50 | 1,32 | 0,87 | 1,15 | 1,26 | |
| Ala omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,50 | 1,63 | 0,78 | 0,90 | 1,17 | 0,940 |
| | Ostalo | 6 | 0,45 | 1,42 | 0,63 | 0,98 | 1,29 | |
| Glu omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,65 | 1,45 | 0,94 | 1,03 | 1,19 | 0,970 |
| | Ostalo | 6 | 0,56 | 1,20 | 0,86 | 1,05 | 1,17 | |
| His omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,71 | 1,26 | 0,90 | 0,95 | 1,05 | 0,880 |
| | Ostalo | 6 | 0,42 | 1,11 | 0,77 | 1,01 | 1,08 | |
| Arg omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,55 | 1,46 | 0,83 | 0,93 | 1,02 | 0,306 |
| | Ostalo | 6 | 0,45 | 1,41 | 0,73 | 1,07 | 1,35 | |
| Pro omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,63 | 1,60 | 0,89 | 1,12 | 1,23 | 0,940 |
| | Ostalo | 6 | 0,53 | 1,30 | 0,81 | 1,07 | 1,28 | |
| Lys omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,60 | 1,24 | 0,90 | 1,05 | 1,16 | 0,791 |
| | Ostalo | 6 | 0,39 | 1,22 | 0,76 | 1,04 | 1,15 | |
| Met omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,58 | 6,75 | 0,83 | 0,98 | 1,41 | 0,325 |
| | Ostalo | 6 | 0,50 | 1,99 | 0,70 | 0,81 | 1,83 | |
| Val omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,77 | 1,35 | 0,89 | 1,05 | 1,17 | 0,677 |
| | Ostalo | 6 | 0,63 | 1,18 | 0,95 | 1,12 | 1,15 | |
| Nva omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,63 | 1,22 | 0,87 | 0,99 | 1,07 | 0,011* |
| | Ostalo | 6 | 1,01 | 1,22 | 1,03 | 1,14 | 1,17 | |
| Tyr omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,63 | 1,59 | 0,97 | 1,04 | 1,13 | 0,910 |
| | Ostalo | 6 | 0,47 | 1,27 | 0,84 | 1,08 | 1,21 | |
| Ile omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,79 | 1,28 | 0,91 | 1,06 | 1,15 | 0,570 |
| | Ostalo | 6 | 0,37 | 1,14 | 0,82 | 1,06 | 1,09 | |
| Leu omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,82 | 1,29 | 0,94 | 1,08 | 1,15 | 0,596 |
| | Ostalo | 6 | 0,38 | 1,19 | 0,84 | 1,13 | 1,17 | |
| Nle omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,67 | 2,33 | 0,98 | 1,27 | 1,44 | 0,649 |
| | Ostalo | 6 | 0,52 | 1,44 | 0,93 | 1,10 | 1,40 | |
| Phe omjer | Odlična blastocista | 34 | 0,55 | 1,27 | 0,92 | 1,01 | 1,07 | 0,583 |
| | Ostalo | 6 | 0,49 | 1,21 | 0,81 | 1,05 | 1,15 | |

N – broj uzoraka u ispitivanoj skupini; AK – aminokiseline; Ala alanin, Arg arginin, Asn asparagin, Asp aspartat, Cys cistein, Gln glutamin, Glu glutamat, Gly glicin, His histidin, Ile izoleucin, Lys lizin, Leu leucin, Met metionin, Nle norleucin, Nva norvalin, Phe fenilalanin, Pro prolin, Ser serin, Thr treonin, Tyr tirozin, Trp triptofan, Val valin.

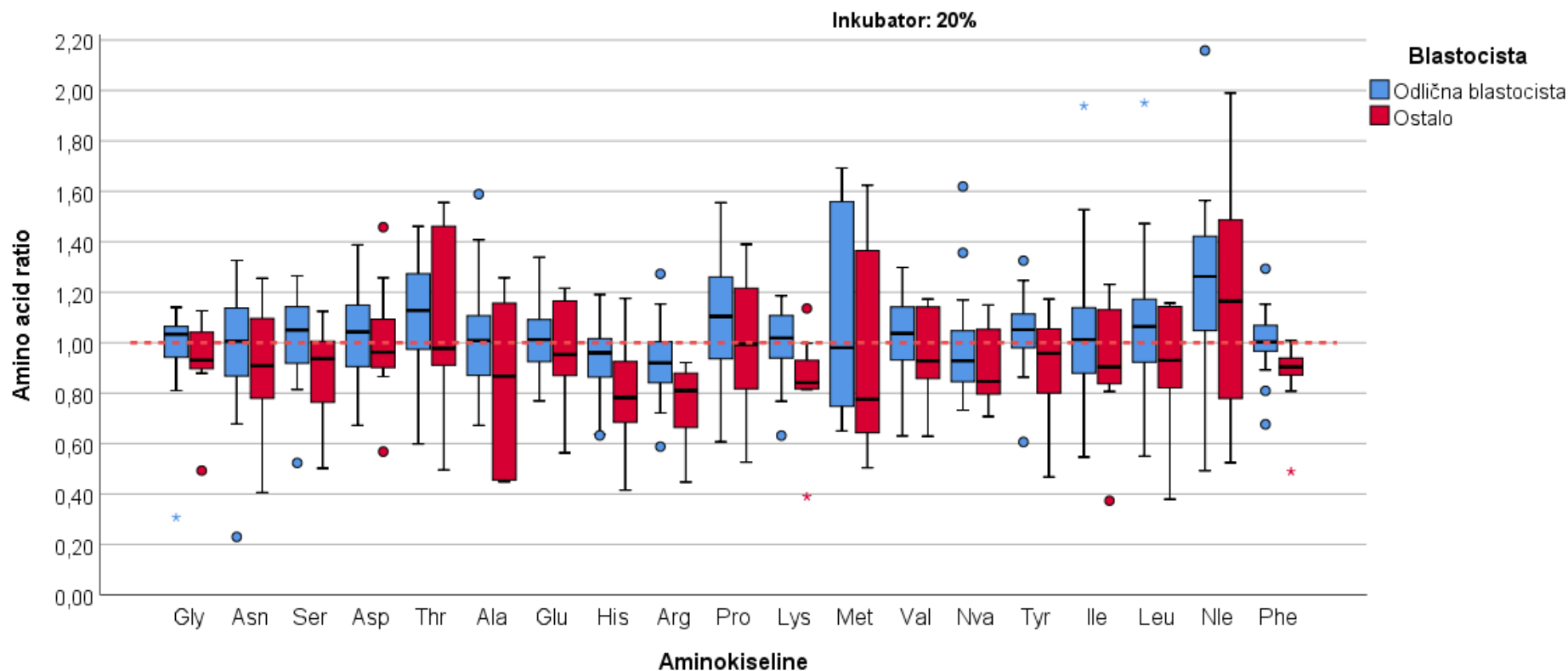
Tablica 18. Usporedbe vrijednosti obrtaja pojedinih aminokiselina u odnosu na referentnu podlogu između loših i odličnih blastocista za skupinu inkubatora s 20% udjelom kisika: Mann-Whitney U test

| AK | Tip blastociste (20% O ₂) | N | Min | Max | Centile | | | P (< 0,05)* |
|-----------|---------------------------------------|----|------|------|---------|---------|------|-------------|
| | | | | | 25. | Medijan | 75. | |
| Gly omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,31 | 1,14 | 0,94 | 1,03 | 1,06 | 0,303 |
| | Ostalo | 10 | 0,49 | 1,13 | 0,89 | 0,93 | 1,06 | |
| Asn omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,23 | 1,33 | 0,86 | 1,01 | 1,14 | 0,492 |
| | Ostalo | 10 | 0,41 | 1,26 | 0,77 | 0,91 | 1,12 | |
| Ser omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,52 | 1,27 | 0,91 | 1,05 | 1,15 | 0,029* |
| | Ostalo | 10 | 0,50 | 1,12 | 0,75 | 0,94 | 1,02 | |
| Asp omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,67 | 1,39 | 0,90 | 1,04 | 1,15 | 0,574 |
| | Ostalo | 10 | 0,57 | 1,46 | 0,89 | 0,96 | 1,13 | |
| Thr omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,60 | 1,46 | 0,96 | 1,13 | 1,28 | 0,901 |
| | Ostalo | 10 | 0,50 | 1,56 | 0,87 | 0,98 | 1,47 | |
| Ala omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,67 | 1,59 | 0,87 | 1,01 | 1,12 | 0,134 |
| | Ostalo | 10 | 0,45 | 1,26 | 0,45 | 0,87 | 1,16 | |
| Glu omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,77 | 1,34 | 0,92 | 1,01 | 1,11 | 0,318 |
| | Ostalo | 10 | 0,56 | 1,22 | 0,86 | 0,95 | 1,18 | |
| His omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,63 | 1,19 | 0,85 | 0,96 | 1,02 | 0,036* |
| | Ostalo | 10 | 0,42 | 1,18 | 0,66 | 0,78 | 0,94 | |
| Arg omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,59 | 1,27 | 0,84 | 0,92 | 1,02 | 0,006 |
| | Ostalo | 10 | 0,45 | 0,92 | 0,65 | 0,81 | 0,89 | |
| Pro omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,61 | 1,56 | 0,93 | 1,10 | 1,26 | 0,357 |
| | Ostalo | 10 | 0,53 | 1,39 | 0,80 | 0,99 | 1,22 | |
| Lys omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,63 | 1,19 | 0,92 | 1,02 | 1,11 | 0,012* |
| | Ostalo | 10 | 0,39 | 1,14 | 0,82 | 0,84 | 0,95 | |
| Met omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,65 | 3,41 | 0,74 | 0,98 | 1,56 | 0,179 |
| | Ostalo | 10 | 0,50 | 5,81 | 0,63 | 0,78 | 1,43 | |
| Val omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,63 | 1,30 | 0,93 | 1,04 | 1,14 | 0,142 |
| | Ostalo | 10 | 0,63 | 1,17 | 0,84 | 0,93 | 1,14 | |
| Nva omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,73 | 1,62 | 0,84 | 0,93 | 1,05 | 0,303 |
| | Ostalo | 10 | 0,71 | 1,15 | 0,78 | 0,85 | 1,08 | |
| Tyr omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,61 | 1,33 | 0,98 | 1,05 | 1,12 | 0,034* |
| | Ostalo | 10 | 0,47 | 1,17 | 0,79 | 0,96 | 1,06 | |
| Ile omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,55 | 1,94 | 0,88 | 1,01 | 1,14 | 0,365 |
| | Ostalo | 10 | 0,37 | 1,23 | 0,83 | 0,90 | 1,13 | |
| Leu omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,55 | 1,95 | 0,92 | 1,06 | 1,17 | 0,142 |
| | Ostalo | 10 | 0,38 | 1,16 | 0,82 | 0,93 | 1,15 | |
| Nle omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,49 | 4,20 | 1,03 | 1,26 | 1,42 | 0,617 |
| | Ostalo | 10 | 0,52 | 1,99 | 0,75 | 1,16 | 1,55 | |
| Phe omjer | Odlična blastocista | 30 | 0,68 | 1,29 | 0,96 | 1,00 | 1,07 | 0,001* |
| | Ostalo | 10 | 0,49 | 1,01 | 0,86 | 0,90 | 0,94 | |

N – broj uzoraka u ispitivanoj skupini; AK – aminokiseline; Ala alanin, Arg arginin, Asn asparagin, Asp aspartat, Cys cistein, Gln glutamin, Glu glutamat, Gly glicin, His histidin, Ile izoleucin, Lys lizin, Leu leucin, Met metionin, Nle norleucin, Nva norvalin, Phe fenilalanin, Pro prolin, Ser serin, Thr treonin, Tyr tirozin, Trp triptofan, Val valin



Slika 25. Vrijednosti obrtaja pojedinih aminokiselina u odnosu na referentnu podlogu između loših i odličnih blastocista za skupinu inkubatora s 5% udjelom kisika. Box plot predstavlja interkvartilni raspon (gornja granica – 75 centila, donja granica – 25 centila), linija u sredini box plota predstavlja medijan. Gornja crta predstavlja max., a donja min. vrijednost Kružić predstavlja stršeću vrijednost 1,5 vrijednosti IQR od medijana. Zvezdica predstavlja stršeću vrijednost 3 puta vrijednosti IQR od medijana. Ala alanin, Arg arginin, Asn asparagin, Asp aspartat, Cys cistein, Gln glutamin, Glu glutamat, Gly glicin, His histidin, Ile izoleucin, Lys lizin, Leu leucin, Met metionin, Nle norleucin, Nva norvalin, Phe fenilalanin, Pro prolin, Ser serin, Thr treonin, Tyr tirozin, Trp triptofan, Val valin.



Slika 26. Vrijednosti obrtaja pojedinih aminokiselina u odnosu na referentnu podlogu između loših i odličnih blastocista za skupinu inkubatora s 20% udjelom kisika. Box plot predstavlja interkvartilni raspon (gornja granica – 75 centila, donja granica – 25 centila), linija u sredini box plot predstavlja medijan. Gornja crta predstavlja max., a donja min. vrijednost Kružić predstavlja stršeću vrijednost 1,5 vrijednosti IQR od medijana. Zvezdica predstavlja stršeću vrijednost 3 puta vrijednosti IQR od medijana. Ala alanin, Arg arginin, Asn asparagin, Asp aspartat, Cys cistein, Gln glutamin, Glu glutamat, Gly glicin, His histidin, Ile izoleucin, Lys lizin, Leu leucin, Met metionin, Nle norleucin, Nva norvalin, Phe fenilalanin, Pro prolin, Ser serin, Thr treonin, Tyr tirozin, Trp triptofan, Val valin.

5. RASPRAVA

Povijesno, većina laboratorija za pomognutu oplodnju kultivirala je zametke u inkubatorima s 20% O₂. Uvođenje malih, stolnih inkubatora sa sniženom razinom O₂ (5%) predstavljalo je dodatne troškove – za novu opremu kao i za skuplje mješavine plinova koje takvi inkubatori koriste (5% O₂, 6% CO₂, 89% N₂). Pretpostavka da će kultivacija zametaka u takvim uvjetima rezultirati većim brojem kvalitetnih blastocista i višim stopama kliničkih trudnoća opravdala bi dodatne troškove.

U ovom istraživanju smo pokušali dokazati opravdanost korištenja inkubatora sa sniženom koncentracijom kisika te utjecaj različitih uvjeta kultivacije na metabolizam i razvoj optimalnih zametaka odnosno onih koji su doveli do trudnoće.

Za razliku od dosadašnjih istraživanja u naše istraživanje smo uključili pacijentice s jasno definiranim osnovnim značajkama kod kojih smo radili embriotransfer samo jedne blastociste 5. dan kultivacije (SET) što nam je omogućilo potpunu sljedivost rezultata te smo mogli pratiti kvalitetu transferiranog zametka (blastociste) od oplodnje do rođenja djeteta. Također kultivacijom zametaka do 5. dana smanjujemo pojavnost kromosomskih abnormalnosti (aneuploidija) zametaka s obzirom da zameci do stadija blastociste u nekim slučajevima uspiju popraviti abnormalnosti nastale u ranim mitotičkim diobama (Lagalla i sur. 2017). Druga istraživanja uključivala su kombinirano SET i DET (Waldenstrom i sur. 2009), kombinirano ET 1 ili 2 zametka 3. dan ili 1 ili 2 zametka 5. dan (Kovačić i sur. 2010; Meintjes i sur. 2009) te oocite iz programa donacije (de los Santos i sur. 2013). Istraživanje s oocitama iz programa donacije također može dati dvoznačne rezultate s obzirom da je pravilo da su donatorice mlađe dobi bez problema s plodnošću te ne predstavljaju istraživanu populaciju pacijentica koje se bore s neplodnošću. Također na ishod postupka pomognute oplodnje ne utječe samo jedan parametar tako da ne smijemo u interpretaciji zanemariti i druge faktore kao što su broj prethodnih pokušaja oplodnje, broj dobivenih oocita, vrsta stimulacije i količina IU primijenjenih gonadotropina, način ocjenjivanja zametaka, dob pacijentica, BMI, te ginekološki parametri (operacije maternice, cerviksa, debljina i kvaliteta endometrija, hormonalni status).

Načini kultivacije, vrsta kultivacijskih medija te dinamika izmjene korištenih medija su također faktori koji mogu dovesti do razlike između rezultata različitih istraživanja. U našem istraživanju

koristili smo sekvencijalne medije koji su svojim sastavom specifični za svaki stadij razvoja zametaka te je potrebno mijenjati medij u svakom stadiju. Takve dodatne manipulacije također mogu utjecati na smanjenu kvalitetu zametaka te bi u budućim istraživanjima bilo interesantno koristiti jednostepene medije kod kojih postoji kontinuirana kultivacija u istom mediju 5 dana. Takvi mediji nisu specifični za svaki stadij razvoja već zametku pružaju sve nutrijente u suvišku s idejom da će zametak sam iskoristi samo ono što mu je potrebno.

Potencijalno ograničenje našeg istraživanja je različita vrsta i tip inkubatora za dvije ispitivane skupine (5% i 20%) koji su korišteni za istraživanje. MINC stolni inkubatori su superiorniji u odnosu na klasične inkubatore ne samo zbog mogućnosti korištenja snižene koncentracije kisika već i zbog manjeg volumena s odvojenim komorama koje osiguravaju veću stabilnost parametara - brži oporavak pH i stabilnije održavanje temperature. Brži oporavak kritičnih parametara može značajno utjecati na rezultate te smo tu razliku pokušali minimalizirati dnevnim ograničenjem broja otvaranja inkubatora te definiranim maksimalnim dnevnim brojem pacijenata u svakom inkubatoru. Smanjenjem broja otvaranja inkubatora s 6 na 4 puta kroz 6 dana kultivacije značajno pospješujemo postotak zametaka koji se razvijaju do stadija blastociste te njihovu kvalitetu (Zhang i sur. 2010). Maksimalan broj uzoraka od pacijentica po inkubatoru odgovarao je broju odvojenih komora.

5.1. Utjecaj snižene koncentracije kisika na razvoj optimalnih zametaka

5.1.1. Klinički parametri

Klinički parametri nam služe kao mjerna jedinica embrionalnog razvoja. Embrionalni razvoj zametaka procjenjujemo metodom procjene morfologije ali da bismo dobili potvrdu naše subjektivne procjene potrebno je odrediti stupanj oplodnje, postotak trudnoća po prijenosu zametaka te postotak živorođene djece kao konačan rezultat razvoja zametaka.

Postotak trudnoća po prijenosu zametaka (CPR) u našem istraživanju je statistički značajno povećan u skupini zametaka kultiviranih s 5% O₂. Vjerojatnost da će pacijentica ostvariti trudnoću bila je 2,46 puta veća u grupi sa sniženim kisikom. Cochrane-ova analiza iz 2012. (Bontekoe i sur. 2012) na temelju 4 istraživanja (Kovačić i sur. 2010; Meintjes i sur. 2009; Waldenstrom i sur. 2009;

Sepulveda S. 2011) također utvrđuje pozitivnu korelaciju postotka trudnoća sa sniženom koncentracijom kisika (OR 1,35; 95% CI 1,08 do 1,67; P= 0,007).

Pri usporedbi rezultata trudnoća moramo obratiti pozornost na dizajn istraživanja – da li su prikazani rezultati istraživanja uključivali ET 2. ili 3. dan odnosno ET blastociste 5. dan. U mnogim istraživanjima provedenim na animalnim i ljudskim zamecima pozitivan utjecaj sniženog udjela kisika i negativan utjecaj povišenog udjela kisika vidljiv je tek u kasnijim stadijima razvoja zametaka – blastocistama (Quinn i Harlow 1978; Umaoka i sur. 1992; Goto i sur. 1993; Pabon i sur. 1989; McKiernan i Bavister 1990). Meintjes i sur. (2009) navode značajno bolje postotke trudnoća u skupini sa sniženim kisikom samo kod pacijentica kod kojih je ET učinjen 5. dan no ne i kod onih kod kojih je učinjen 2. ili 3. dan. Pretpostavka je da se produljenom kultivacijom s 20% O₂ stvara više slobodnih kisikovih radikala. No brojne studije na životinjama su pokazale da čak i kratko izlaganje zametaka u ranijim stadijima povišenoj koncentraciji kisika može biti detrimentalno, a posljedice vidljive tek u kasnijim stadijima razvoja zametaka (Pabon i sur. 1989; Karagenc i sur. 2004). Stoga možemo zaključiti da oštećenja zbog suboptimalne razine kisika mogu biti prisutna od samog početka razvoja zametka ali njihov utjecaj postaje značajan tek u kasnijim stadijima razvoja i prikazuje se kao izmijenjeni metabolizam i/ili genska ekspresija sa smanjenom vijabilnošću zametka (Meintjes i sur. 2009).

Kod postotka živorođene djece nismo dokazali superiornost kultivacije sa sniženom razinom kisika za razliku od ostalih studija koje navode značajno veći postotak LBR (Nastri i sur. 2016; Waldenstrom i sur. 2009; Meintjes i sur. 2009; Bontekoe i sur. 2012). Moguće objašnjenje za naše rezultate je činjenica da je jedino naše istraživanje bazirano isključivo na embriotransferu jedne blastociste. U ostalim istraživanjima vršio se ET jednog ili dva zametka/blastociste što je moglo dovesti do više plodnih trudnoća te povećati postotak živorođene djece. Također bitno je istaknuti da LBR ne ovisi samo o kvaliteti zametka već i o kromosomskim abnormalnostima zametka te majčinim endokrinim i imunološkim poremećajima kao i o poremećajima vezanim uz trombofiliju koje mogu dovesti do spontanih pobačaja (Christiansen i sur. 2006).

Usporedbom tri dobne skupine nismo zabilježili značajne razlike no rezultati u svim dobnim skupinama za sve parametre pokazuju bolje rezultate u korist snižene razine kisika.

Samo jedna studija navodi rezultate s obzirom na dobne skupine (Meintjes i sur. 2009) te nalazi statistički značajne razlike u stupnju implantacije (P= 0,039) u najmlađoj dobnj skupini (≤ 34

godina) te postotku živorođene djece po implantaciji (broj živorođene djece po broju transferiranih zametaka) – $P= 0,011$ u srednjoj dobnoj skupini (38-40 godina). Značajne razlike ne nalaze niti u jednoj dobnoj skupini u postotku trudnoća po prijenosu zametka kao ni u postotku živorođene djece. Ti rezultati nisu usporedivi s našim istraživanjem s obzirom da su vraćali kombinirano jedan ili dva zametka, različito podijelili dobne skupine (≤ 34 , 35-37, 38-40, >40) te koristili različite definicije kliničkih parametara.

5.1.2. Embriološki parametri

Kada govorimo o morfološkom ocjenjivanju kvalitete zametaka moramo voditi brigu o potencijalnim odstupanjima koja su posljedica razlike u načinu ocjenjivanja različitih zametaka, između ocjenjivanja različitih embriologa unutar istog laboratorija i razlika između ocjenjivanja embriologa iz različitih laboratorija (Lundin i Ahlstrom 2015). Potencijalno ograničenje našeg istraživanja je sudjelovanje četiri embriologa pri ocjenjivanju zametaka s obzirom na dinamiku rada u laboratoriju. Iako je standardizacija ocjenjivanja dokumentirana u našim standardnim operativnim postupcima te se kao takva primjenjuje u dnevnoj rutini razlike zbog subjektivne procjene kvalitete su moguće.

Kultivacijom zametaka u inkubatoru s 5% O_2 utvrdili smo značajno povećan stupanj oplodnje. Dosadašnje studije nisu utvrdile povećan stupanj oplodnje (de los Santos i sur. 2013; Waldenstrom i sur. 2009; Nastri i sur. 2016; Kovačić i Vlaisavljević 2008; Meintjes i sur. 2009; Gomes Sobrinho i sur. 2011). Stupanj oplodnje uvelike ovisi o broju dobivenih oocita odnosno broju oocita stavljenih na oplodnju. Zakonom o medicinski pomognutoj oplodnji iz 2012. godine određeno je da na oplodnju smijemo staviti maksimalan broj od 12 oocita, a višak kvalitetnih i zrelih oocita moramo kriopohraniti i sukladno tome određuje se stimulacija u kojoj se neće razviti prekomjeran broj oocita. Stoga u našem istraživanju neovisno o broju dobivenih oocita na oplodnju smo smjeli staviti maksimalno 12 oocita. U drugim istraživanjima nisu postojala takva ograničenja te je oplodnja bila moguća i na većem broju oocita. Veći broj oocita dobiven u ovarijskoj stimulaciji u korelaciji je sa sniženim stupnjem oplodnje ali ne utječe na stupanj ostvarenih trudnoća (Kok i sur. 2006). Razlog tome je veći broj nezrelih oocita i citoplazmatska nezrelost, a ne lošija kvaliteta oocita. Za razliku od ostalih istraživanja gdje su u takvim slučajevima sve oocite stavljene na oplodnju, mi smo u slučaju većeg broj oocita odabirali najboljih i zrelih 12 oocita koje ćemo staviti

na oplodnju. Pozitivnim probirom smo sigurno utjecali na bolji rezultat iako time nismo utjecali na značajnost razlike između dvije ispitivane skupine.

Broj oocita u postupku (broj oocita stavljenih na oplodnju) nije se značajno razlikovao među ispitivanim skupinama kao ni broj oplođenih oocita što također možemo objasniti ograničenim brojem oocita koje smijemo oploditi.

Broj zametaka 3. dan i blastocista 5. dan kao i broj odličnih zametaka 3. dan i blastocista 5. dan nije dosegao statistički značajnu razliku iako smo zabilježili bolje rezultate u skupini sa sniženom koncentracijom kisika.

Udio odličnih zametaka 3. dan statistički značajno je bio veći u skupini kultiviranoj sa sniženom razinom kisika u usporedbi sa zamecima kultiviranim s 20% O₂. Udio odličnih blastocista 5. dan nije bio statistički značajan iako smo zabilježili bolje rezultate u skupini sa sniženom koncentracijom kisika.

S obzirom da je udio odličnih zametaka 3. dan bio značajan kao i postotak trudnoća po prijenosu zametaka možemo pretpostaviti da udio odličnih blastocista nije dosegao značajnu vrijednost zbog nedovoljno preciznog ocjenjivanja ili pak razlika u ocjenjivanju blastocista. Pri ocjenjivanju blastocista ocjenjuju se tri parametara - npr. ako imamo slabije ekspaniranu blastocistu to će nam otežati kvalitetnu procjenu embrionalnog čvorića te ćemo takvu blastocistu prema konsenzusu procijeniti kao vrlo dobru, a samo sat vremena kasnije (vrijeme procjene ± 1 sat) ta ista blastocista se može potpuno ekspanirati i prikazati lijep embrionalni čvorić i dobiti ocjenu odlične blastociste. Zato pri ocjenjivanju morfologije treba paziti i na vremenske okvire u kojima se izvodi procjena što ponekad u dnevnoj rutini nije moguće te se zameci ocjenjuju sa sat vremena zaostatka.

Četiri studije koje navode embriološke parametre razlikuju se u dužini trajanja kultivacije odnosno danu embriotransfera. De los Santos i sur. (2013) utvrdili su značajno veći postotak odličnih zametaka 3. dan, a Kovačić i Vlasisavljević (2008) značajno veći postotak optimalnih zametaka 2., 3. dan, morula 4. dan te blastocista 5. dan. Kovačić i sur. (2010) navode da je kvaliteta zametaka značajno ($P < .001$ za zametke 2. dan i blastociste) povezana s koncentracijom kisika u korist 5% O₂. Jedina studija koja je sve zametke kultivirala isključivo do 5. dana kao i mi nije utvrdila značajno veći postotak odličnih blastocista u skupini sa sniženom koncentracijom kisika iako

navodi značajno veći postotak blastocista, veći postotak razvoja blastocista po broju fertiliziranih oocita te veći prosječan broj krioprezerviranih blastocista (Waldenstrom i sur. 2009).

Kada smo blastociste podijelili prema kvaliteti (1= odlična, 2= srednja, 3= loša) također nismo utvrdili značajnu razliku između ispitivanih skupina iako smo zabilježili trend ka boljoj kvaliteti blastocista u skupini s 5% O₂ – više kvalitetnih blastocista, a manje loših i srednjih.

Usporedbom rezultata tri dobne skupine statistički značajnu razliku u korist snižene koncentracije kisika smo utvrdili samo u najmlađoj skupini pacijentica za udio oplodjenih oocita. Za sve ostale parametre nismo utvrdili statističku značajnost iako su rezultati bolji u skupini zametaka kultiviranim sa sniženom razinom kisika. Nismo pronašli studiju koja navodi embriološke parametre podijeljene s obzirom na dobne skupine.

Iako razlika nije statistički značajna, 44,6% odlično ocijenjenih blastocista rezultiralo je trudnoćom te su bile povezane s dvostruko većim udjelom trudnoća u odnosu na ostale. Možemo zaključiti da metodom procjene morfologije zametaka u velikom postoku možemo predvidjeti ishod postupaka pomognute oplodnje.

5.2. Utjecaj snižene koncentracije kisika na metabolizam aminokiselina optimalnih zametaka

Sekvencijalni mediji za fertilizaciju i diobu sadrže samo ne-esencijalne aminokiseline dok medij za kulturu blastocista sadrži sve aminokiseline (ne-esencijalne i esencijalne). Istraživanje je bilo bitno sprovesti u stadiju u kojem su dodane sve aminokiseline i kada je metabolička aktivnost najveća te koristiti metodu koja ima mogućnost analize svih aminokiselina odjednom. Lane i Gardner (1998) su pokazali da prisutnost svih 20 aminokiselina može reducirati utjecaj stresora *in vitro*. Kultivacija zametaka bez dodanih aminokiselina i vitamina rezultira gubitkom regulacije metabolizma, a metabolički stres osim što smanjuje stupanj implantacije utječe i na fetalni razvoj, rezultirajući manjom porođajnom težinom djece (Gardner i Wale 2013).

Potencijalna ograničenja u usporedbi rezultata s drugim studijama su korištenje različitih kultivacijskih medija, analiza metabolizma u različitim stadijima razvoja (2., 3. ili 5. dan) te korištenje različitih protokola, metoda i uređaja za analizu metabolizma (Houghton i sur. 2002;

Brison i sur. 2004; Drabkova i sur. 2016; Zhao i sur. 2013; Seli i sur. 2010). Prema našim saznanjima naše istraživanje je jedino koje je uključilo utjecaj različitih koncentracija kisika na obrtaj pojedinih aminokiselina humanih zametaka s obzirom na ishod trudnoća i kvalitetu blastocista. Također je jedino koje je uključivalo analizu medija u kojem je kultivirana blastocista (od 3. do 5. dana) koju ćemo transferirati (SET). Time smo smanjili pogrešno tumačenje rezultata utjecaja metabolizma na razvoj odličnih zametaka (više plodne trudnoće, dva različita alikvota medija za dva različita zametka koji su transferirani zajedno) te omogućili precizniju interpretaciju krajnjih ishoda (CPR, LBR).

5.2.1. Usporedna procjena metabolizma svih zametaka

Usporedbom svih zametaka u dvije ispitivane skupine (5% i 20% O₂) nismo našli značajne razlike u vrijednostima obrtaja pojedinih aminokiselina.

Glicin, serin, aspartat, treonin, glutamat, prolin, lizin, valin, norvalin, leucin, fenilalanin i izoleucin su se više izlučivali, a norleucin manje u medij za kultivaciju u skupini s 5% O₂. Asparagin je u obje skupine zadržao bazalnu vrijednost iz podloge, a tirozin se podjednako izlučivao u podlogu također u obje skupine. Alanin se više trošio, a histidin, arginin i metionin manje u podlozi s 5% O₂.

Naše rezultate možemo usporediti samo s istraživanjem Wale i Gardnera (2012) koji su uspoređivali metabolizam aminokiselina prekompakcijskih i postkompakcijskih zametaka miševa kultiviranih u različitim koncentracijama kisika. Ograničenje njihovog istraživanja je kultivacija po tri zametka u istoj kapljici samo kroz 24 sata (4. do 5. dan). Za razliku od našeg, u njihovom istraživanju izlučivali su se samo alanin i glutamin bez obzira na korištenu razinu kisika. Nastanak viška glutamina objašnjavaju konverzijom glutamata u glutamin pomoću glutamin sintetaze pri čemu se uklanjaju slobodni amonijevi ioni koji su toksični za zametke. Nastanak viška alanina je posljedica transaminacije piruvata te također dolazi do uklanjanja viška slobodnih amonijevih iona. U našem istraživanju alanin se više trošio, a glutamin nije bio u mjerljivim koncentracijama. Potencijalno objašnjenje razlike u rezultatima je razlika u načinu kultivacije – mi smo kultivirali po jedan zametak u kapljici puno većeg volumena te smo samim time smanjili količinu slobodnih amonijevih iona te nije postojala potreba za povećanom sintezom alanina i glutamina kako bi se oni uklonili.

Možemo zaključiti da nema razlike u metabolizmu zametaka kultiviranih u različitim uvjetima (5% O₂ i 20% O₂) kada zametke uspoređujemo neovisno o kvaliteti i ishodu. Ovo nam potencijalno dokazuje da razinu metaboličke aktivnosti određuje kvaliteta zametka odnosno da je metabolička aktivnost rezultat aktivnosti zametka kojom pokušava spriječiti zastoj u razvoju.

5.2.2. Usporedna procjena metabolizma zametaka koji su rezultirali trudnoćom

Kada smo zametke podijelili na one koji su doveli do trudnoće i one koji nisu u skupini sa sniženim udjelom kisika pronašli smo značajnu razliku u obrtaju aminokiseline arginin. Zameci koji su rezultirali trudnoćom trošili su više arginina.

Značajno povećanu potrošnju arginina kod zametaka koji su rezultirali trudnoćom možemo objasniti njegovom pretvorbom u dušikov monoksid. Iz arginina se pomoću dušik oksid sintaze stvara dušikov monoksid (engl. nitric oxide – NO) koji je signalna molekula te se dovodi u pozitivnu korelaciju s trudnoćama kod rhesus majmuna (Sengupta i sur. 2005).

Obrtaji ostalih aminokiselina nisu pokazali značajnu razliku. Serin, treonin, prolin, lizin, izoleucin i norleucin su se više izlučivali u podlogu kod zametaka koji su rezultirali trudnoćom dok su se glicin, aspartat, glutamat, valin, tirozin i leucin izlučivali manje. Alanin, histidin i arginin su se više trošili iz podloge. Asparagin, metionin i fenilalanin su se kod zametaka koji su doveli do trudnoće trošili, a kod onih koji nisu doveli do trudnoće izlučivali u podlogu. Norvalin se kod onih sa trudnoćom izlučivao u podlogu, a kod onih bez trudnoće trošio iz podloge.

U skupini s povećanim udjelom kisika statistički značajan je bio obrtaj metionina (P= 0,036).

S obzirom da je metionin pokazao nestabilnost u internom standardu ovaj rezultat moramo tumačiti s oprezom. Metionin se kod zametaka koji su doveli do trudnoće izlučivao u podlogu dok se kod zametaka koji nisu doveli do trudnoće trošio iz podloge.

Obrtaji ostalih aminokiselina nisu pokazali značajne razlike. Asparagin, serin, treonin, alanin, metionin i tirozin su se izlučivali više u podlogu kod zametaka koji su doveli do trudnoće, a glicin, prolin i norleucin manje. Podjednako se izlučivao arginin. Kod zametaka koji su rezultirali trudnoćom aspartat, glutamat, lizin, izoleucin i leucin su se trošili iz podloge, a kod zametaka koji nisu doveli do trudnoće su se izlučivali u podlogu. Histidin i norvalin su se trošili više iz podloge, a fenilalanin manje kod zametaka koji su doveli do trudnoće.

Podjelom na zametke koji su doveli do trudnoće i one koji nisu nismo napravili apsolutnu podjelu s obzirom na kvalitetu zametaka jer kao što smo utvrdili morfološkom procjenom samo 44,6% odlično ocijenjenih blastocista rezultiralo je trudnoćom pa stoga vjerojatno nismo niti detektirali velike razlike u metabolizmu. Rezultate nismo mogli usporediti s drugim istraživanjima jer nitko nije uspoređivao utjecaj različitih koncentracija kisika na ishod trudnoća.

5.2.3. Usporedna procjena metabolizma zametaka s najboljom morfološkom ocjenom

Usporednom procjenom metabolizma zametaka s najboljom morfološkom ocjenom kultiviranih sa sniženim udjelom kisika statistički se značajno razlikovao samo obrtaj norvalina ($P= 0,011$).

Istraživanje *in vivo* na ne-rekombinantnom soju E.coli je pokazalo da u anaerobnim uvjetima pri sniženoj koncentraciji kisika visoke koncentracije glukoze dovode do brze akumulacije piruvata koji je primarni supstrat za biosintezu norvalina i norleucina te dolazi do brze sinteze i akumulacije norvalina (Apostol i sur. 1997; Soini i sur. 2008). Ako bismo to interpretirali s našim rezultatima zaključili bismo da odlični zameci troše više glukoze nego loši te je stoga više norvalina izlučeno u mediju s lošim zamecima. Druga istraživanja metabolizma aminokiselina nisu uključivala analizu norvalina.

Obrtaji ostalih aminokiselina nisu pokazali značajnu razliku. Zameci s najboljom morfološkom ocjenom u skupini sa sniženom koncentracijom kisika izlučivali su više prolina, lizina i norleucina odnosno manje glicina, serina, aspartata, glutamata, valina, tirozina, leucina i fenilalanina od lošijih blastocista. Asparagin je ostao na bazalnoj razini iz podloge, a treonin i izoleucin su se izlučivali jednako. Alanin se više trošio, a metionin manje. Histidin i arginin su se više trošili dok su se kod lošijih blastocista izlučivali.

Zameci koji su se razvili u odličnu blastocistu u skupini s povišenom koncentracijom kisika izlučivali su značajno više serina, lizina i tirozina te trošili manje histidina i arginina nego lošije ocijenjene blastociste. Kod loših blastocista serin, lizin i tirozin su se značajno više trošili iz podloge. Obrtaj fenilalanina je također pokazao statističku značajnost – kod loših blastocista se više trošio, a kod odličnih je ostao na bazalnoj vrijednosti iz podloge. Možemo primijetiti da se kod loših blastocista znatno više aminokiselina iz podloge trošilo dok se kod odličnih više aminokiselina izlučivalo, odnosno produciralo.

Glicin, asparagin, aspartat, treonin, alanin, glutamat, prolin, valin, tirozin, izoleucin, leucin i norleucin su se više izlučivali u podlogu, a metionin i norvalin manje trošili kod odličnih blastocista ali ne statistički značajno. Iako nije statistički značajno kod svih ovih aminokiselina izuzev norleucina smo primijetili njihovu potrošnju kod lošijih blastocista što opet pokazuje obrazac ponašanja u suboptimalnim uvjetima.

Možemo pretpostaviti da u nepovoljnim uvjetima koji izazivaju stres kao što je povišena koncentracija kisika loši zameci koriste aminokiseline iz podloge za stvaranje dodatne energije za razvoj dok ih kod odličnih zametaka koriste za sintezu novih aminokiselina izuzev histidina i arginina koji se troše. Kultivacijom *in vitro* s histidinom blastociste proizvode histamin koji se smatra bitnim lokalnim signalom u uterusu za implantaciju kod zečeva (Dey i sur. 1979) stoga se potrošnja histidina može objasniti njegovom dekarboksilacijom u histamin pomoću enzima histidin dekarboksilaze. Kao što smo već napomenuli, preimplantacijski zametak iz arginina stvara dušikov monoksid koji je također signalna molekula te je potreban za normalan embrionalni razvoj (Gouge i sur. 1998). S obzirom da mi zametke nismo podijeli na odlične i one koji su stali u razvoju već na zametke odlične kvalitete i one koji su se razvili ali su lošije kvalitete ne možemo precizno interpretirati zašto se arginin trošio više kod lošijih zametaka jer su također i neki od tih zametaka mogli rezultirati trudnoćom. Dušikov monoksid bitan je kao signal za implantaciju, a ne kao mjerilo kvalitete zametka te bi bilo vrijednije interpretirati rezultate arginina s obzirom na zametke koji su rezultirali trudnoćom.

Kada ove rezultate usporedimo s metabolizmom odličnih zametaka kultiviranih sa sniženom koncentracijom kisika (iako nisu pokazali značajnost) možemo primijetiti da u takvim povoljnijim uvjetima i odlični i loši zameci izlučuju, odnosno produciraju nove aminokiseline izuzev alanina, histidina, arginina, metionina i norvalina čiji smo metabolizam već objasnili. Dakle možemo pretpostaviti da u optimalnim uvjetima zamecima nije potreban dodatan izvor energije za razvoj.

Pri kultivaciji s povišenom razinom kisika povećana potrošnja serina, histidina, lizina, tirozina i fenilalanina može biti negativni prediktivni faktor razvoja odličnih blastocista. Također pri kultivaciji sa sniženom razinom kisika razvoj odličnih blastocista koje dovode do trudnoća možemo dovesti u pozitivnu korelaciju sa povećanom potrošnjom arginina što je vjerojatno povezano sa proizvodnjom signalnih molekula za implantaciju – dušikovog monoksida koji

stimulira lokalnu vazodilataciju i povećava propusnost kapilara te tako povećava šansu za implantaciju (Gouge i sur. 1998).

Za razliku od našeg istraživanja, Houghton i sur. (2002) su utvrdili da se pri povišenoj koncentraciji kisika više troši serin, arginin, metionin, valin i leucin kod blastocista koje su se razvile (bez ocjene) za razliku od aspartata, glutamata i alanina koji se više produciraju. Wale i Gardner (2012) su utvrdili značajno veću potrošnju treonina, tirozina, metionina, valina, izoleucina, leucina i fenilalanina sa sniženom koncentracijom kisika ali neovisno o kvaliteti blastociste. Producirale su se samo dvije aminokiseline – glutamin i alanin. Možemo primijetiti da se rezultati uvelike razlikuju i nisu usporedivi s obzirom da ne postoji standardizacija metode te je vrlo teško izvesti valjane i jedinstvene zaključke.

Uvođenje i standardizacija nove metode određivanja kvalitete zametaka procjenom metabolizma zametaka je teško ostvariva s obzirom na različite uvjete kultivacije - korištenu koncentraciju kisika, vrstu kultivacijskih medija, volumen medija korišten za kultivaciju i korištenje različitih protokola i opreme za analizu. Iako neke aminokiseline pokazuju prognostičku vrijednost i mogle bi pružiti objektivniju procjenu kvalitete zametaka metoda je vrlo skupa i zahtijeva dugotrajnu obradu s obzirom da bismo u dnevnoj rutini morali testirati sve zametke, a ne samo morfološki najbolje kao u našem istraživanju. Morfološka procjena kvalitete zametaka je brza i rutinska metoda kojom još uvijek u velikom postotku možemo odrediti biološki potencijal zametka za implantaciju. Kontinuiranom edukacijom i validacijom znanja embriologa možemo znatno povećati objektivnost morfološke procjene zametaka.

Ograničenje našeg istraživanja je manjak informacija o metabolizmu glukoze i piruvata što bi nam uvelike olakšalo interpretaciju rezultata te bi bilo vrijedno uključiti u slijedeću studiju.

5.2.4. Tiha embrionalna hipoteza

Tiha embrionalna hipoteza govori da vijabilni zameci imaju „tiši“ metabolizam od onih koji zaostanu u razvoju (Leese 2002). Prema toj hipotezi lošiji zameci moraju iskoristiti više nutrijenata kako bi izvršili popravke nastalih oštećenja. U svom radu Gardner (2013) navodi istraživanja (Lane i Gardner 1996; Gardner i sur. 2011) koja vijabilnost zametaka povezuju s povećanom metaboličkom aktivnosti te smatra da je Leese-ova hipoteza pogrešna jer su istraživanja rađena u

uvjetima s povećanom koncentracijom kisika. Povećana koncentracija kisika (20% O₂) predstavlja suboptimalne uvjete za zametak koji mogu inducirati više oksidativnog stresa te je nizak metabolizam samo reakcija na uvjete stresa. U našem istraživanju smo htjeli provjeriti Leese-ovu hipotezu, odnosno istražiti utjecaj različitih koncentracija kisika na razvoj optimalnih zametaka. Naši rezultati potvrđuju hipotezu s obzirom da smo utvrdili značajno povećano trošenje aminokiselina iz podloge samo u skupini loših zametaka kultiviranih s povišenom koncentracijom kisika.

6. ZAKLJUČCI

1. Upotreba inkubatora sa 5% O₂ povećava biološki potencijal optimalnih zametaka za implantaciju odnosno za ostvarivanje trudnoće. Postotak trudnoća po prijenosu zametaka i stupanj oplodnje značajno su veći u uvjetima kultivacije sa sniženom razinom kisika.
2. Kultivacija zametaka sa sniženom koncentracijom kisika značajno povećava udio zametaka odlične kvalitete 3. dan.
3. Kultivacijom zametaka sa sniženom koncentracijom kisika statistički se značajno povećao stupanj oplodnje samo u najmlađoj skupini pacijentica (≤ 34 god.)
4. Metodom procjene morfologije u velikom postotku (44,6%) možemo predvidjeti ostvarivanje trudnoće no morfološka ocjena zametaka nije u skladu sa stvarnim fiziološkim stanjem zametka. Utvrdili smo da se metabolizam aminokiselina zametaka koje su rezultirale trudnoćom i metabolizam odličnih zametaka razlikuju.
5. Metabolički profil aminokiselina optimalnog zametka, odnosno onog koji se implantirao razlikuje se s obzirom na uvjete kultivacije (5% O₂ ili 20% O₂). U uvjetima snižene koncentracije kisika zametak koji će dovesti do trudnoće značajno više troši arginin dok odlična blastocista troši značajno više norvalina. U uvjetima povišene koncentracije kisika odlična blastocista izlučuje u podlogu značajno više serina, lizina, tirozina i fenilalanina te troši manje histidina i arginina.
6. Naši rezultati potvrđuju Leese-ovu tihu embrionalnu hipotezu s obzirom da smo utvrdili značajno povećano trošenje aminokiselina iz podloge samo u skupini loših zametaka kultiviranih sa povišenom koncentracijom kisika (20%).

7. POPIS LITERATURE

- Alpha Scientists in Reproductive Medicine and Eshre Special Interest Group of Embryology (2011) The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 26 (6):1270-1283.
- Antczak, M., J. Van Blerkom (1999) Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod* 14 (2): 429-447.
- Apostol, I., J. Levine, J. Lippincott, J. Leach, E. Hess, C. B. Glascock, M. J. Weickert, R. Blackmore (1997) Incorporation of norvaline at leucine positions in recombinant human hemoglobin expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 272 (46): 28980-28988.
- Bontekoe, S., E. Mantikou, M. van Wely, S. Seshadri, S. Repping, S. Mastenbroek (2012) Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst Rev* (7): CD008950.
- Botros, L., D. Sakkas, E. Seli (2008) Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 14 (12): 679-690.
- Brison, D. R., F. D. Houghton, D. Falconer, S. A. Roberts, J. Hawkhead, P. G. Humpherson, B. A. Lieberman, H. J. Leese (2004) Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod* 19 (10): 2319-24.
- Catt, J. W., M. Henman (2000) Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod* 15 Suppl 2:199-206.
- Cauffman, G., M. De Rycke, K. Sermon, I. Liebaers, H. Van de Veld (2009) Markers that define stemness in ESC are unable to identify the totipotent cells in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 24 (1): 63-70.
- Christiansen, O. B., H. S. Nielsen, A. M. Kolte (2006) Future directions of failed implantation and recurrent miscarriage research. *Reprod Biomed Online* 13 (1): 71-83.
- Cindric Mario, Marković Ana, Horvatić Anita (2009) Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina Fluminensis* 45 (3): 218-232.

- Ciray, H. N., T. Aksoy, K. Yaramanci, I. Karayaka, M. Bahceci (2009) In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes. *Fertil Steril* 91 (4 Suppl):1459-1461.
- Crosby, I. M., F. Gandolfi, R. M. Moor (1988) Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fertil* 82 (2): 769-775.
- de los Santos, M. J., P. Gamiz, C. Albert, A. Galan, T. Vilorio, S. Perez, J. L. Romero, J. Remohi (2013) Reduced oxygen tension improves embryo quality but not clinical pregnancy rates: a randomized clinical study into ovum donation cycles. *Fertil Steril* 100 (2): 402-407.
- Dey, S. K., D. C. Johnson, J. G. Santos (1979) Is histamine production by the blastocyst required for implantation in the rabbit? *Biol Reprod* 21 (5): 1169-1173.
- Drabkova, P., L. Andrlouva, R. Hampl, R. Kandar (2016) Amino acid metabolism in human embryos. *Physiol Res* 65 (5): 823-832.
- Edwards, L. J., D. A. Williams, D. K. Gardner (1998) Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum Reprod* 13 (12): 3441-3448.
- El Mouatassim, S., P. Guerin, Y. Menezo (1999) Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Mol Hum Reprod* 5 (8): 720-725.
- Fischer, B., B. D. Bavister (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 99 (2): 673-679.
- Fujitani, Y., K. Kasai, S. Ohtani, K. Nishimura, M. Yamada, K. Utsumi (1997) Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro-produced bovine embryos. *J Anim Sci* 75 (2): 483-489.
- Furtado, D. Z. S., F. B. V. de Moura Leite, C. N. Barreto, B. Faria, L. D. L. Jedlicka, E. de Jesus Silva, H. D. T. da Silva, E. J. H. Bechara, N. A. Assuncao (2017) Profiles of amino acids and biogenic amines in the plasma of Cri-du-Chat patients. *J Pharm Biomed Anal* 140: 137-145.
- Gardner, D. K. (2016) The impact of physiological oxygen during culture, and vitrification for cryopreservation, on the outcome of extended culture in human IVF. *Reprod Biomed Online* 32 (2): 137-141.
- Gardner, D. K., M. Lane (2005) Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reprod Fertil Dev* 17 (3): 361-370.

- Gardner, D. K., M. Lane, J. Stevens, W. B. Schoolcraft (2001) Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 76 (6): 1175-1180.
- Gardner, D. K., P. L. Wale (2013) Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril* 99 (4): 1062-1072.
- Gardner, D. K., P. L. Wale, R. Collins, M. Lane (2011) Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Hum Reprod* 26 (8): 1981-1986.
- Glujovsky, D., C. Farquhar, A. M. Quinteiro Retamar, C. R. Alvarez Sedo, D. Blake (2016) Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* (6): CD002118.
- Gomes Sobrinho, D. B., J. B. Oliveira, C. G. Petersen, A. L. Mauri, L. F. Silva, F. C. Massaro, R. L. Baruffi, M. Cavagna, J. G. Franco, Jr. (2011) IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 9:143.
- Goto, Y., Y. Noda, T. Mori, M. Nakano (1993) Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med* 15 (1): 69-75.
- Gouge, R. C., P. Marshburn, B. E. Gordon, W. Nunley Y. M. Huet-Hudson (1998) Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod* 58 (4): 875-879.
- Hardarson, T., G. Caisander, A. Sjogren, C. Hanson, L. Hamberger, K. Lundin (2003) A morphological and chromosomal study of blastocysts developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared with control blastocysts. *Hum Reprod* 18 (2): 399-407.
- Houghton, F. D., J. A. Hawkhead, P. G. Humpherson, J. E. Hogg, A. H. Balen, A. J. Rutherford, H. J. Leese (2002) Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 17 (4): 999-1005.
- Iwata, H., N. Minami, H. Imai (2000) Postnatal weight of calves derived from in vitro matured and in vitro fertilized embryos developed under various oxygen concentrations. *Reprod Fertil Dev* 12 (7-8): 391-396.
- Johnson, M. H., M. H. Nasr-Esfahani (1994) Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *Bioessays* 16 (1): 31-38.

- Karagenc, L., Z. Sertkaya, N. Ciray, U. Ulug, M. Bahceci (2004) Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reprod Biomed Online* 9 (4): 409-417.
- Katz-Jaffe, M. G., D. W. Linck, W. B. Schoolcraft, D. K. Gardner (2005) A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development. *Reproduction* 130 (6): 899-905.
- Kea, B., J. Gebhardt, J. Watt, L. M. Westphal, R. B. Lathi, A. A. Milki, B. Behr (2007) Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 87 (1): 213-216.
- Kok, J. D., C. W. Looman, S. M. Weima, E. R. te Velde (2006) A high number of oocytes obtained after ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection is not associated with decreased pregnancy outcome. *Fertil Steril* 85 (4): 918-924.
- Kovačić, B., M. C. Sajko, V. Vlaisavljević (2010) A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 94 (2): 511-519.
- Kovačić, B., V. Vlaisavljević (2008) Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reprod Biomed Online* 17 (2): 229-236.
- Kwon, H. C., H. W. Yang, K. J. Hwang, J. H. Yoo, M. S. Kim, C. H. Lee, H. S. Ryu, K. S. Oh (1999) Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro. *J Obstet Gynaecol Res* 25 (5): 359-366.
- Lagalla, C., N. Tarozzi, R. Sciajno, D. Wells, M. Di Santo, M. Nadalini, V. Distratis, A. Borini (2017) Embryos with morphokinetic abnormalities may develop into euploid blastocysts. *Reprod Biomed Online* 34 (2): 137-146.
- Lane, M., D. K. Gardner (1996) Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Hum Reprod* 11 (9): 1975-1978.
- Lane, M., D. K. Gardner (1998) Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum Reprod* 13 (4): 991-997.
- Lane, M., D. K. Gardner (2005) Mitochondrial malate-aspartate shuttle regulates mouse embryo nutrient consumption. *J Biol Chem* 280 (18): 18361-18367.

- Leese, H. J. (1991) Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. *Oxf Rev Reprod Biol* 13: 35-72.
- Leese, H. J. (2002) Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays* 24 (9): 845-849.
- Liu, Z., R. H. Foote (1995) Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol Reprod* 53 (4): 786-790.
- Lundin, K., A. Ahlstrom (2015) Quality control and standardization of embryo morphology scoring and viability markers. *Reprod Biomed Online* 31 (4): 459-471.
- Magli, M. C., G. M. Jones, K. Lundin, E. van den Abbee (2012) Atlas of human embryology: from oocytes to preimplantation embryos. Preface. *Hum Reprod* 27 Suppl 1:i1.
- Mangge, H., S. Zelzer, F. Pruller, W. J. Schnedl, D. Weghuber, D. Enko, P. Bergsten, J. Haybaeck, A. Meinitzer (2016) Branched-chain amino acids are associated with cardiometabolic risk profiles found already in lean, overweight and obese young. *J Nutr Biochem* 32: 123-127.
- McKiernan, S. H., B. D. Bavister (1990) Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 43 (3): 404-413.
- Meintjes, M., S. J. Chantilis, J. D. Douglas, A. J. Rodriguez, A. R. Guerami, D. M. Bookout, B. D. Barnett, J. D. Madden (2009) A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum Reprod* 24 (2): 300-307.
- Nastri, C. O., B. N. Nobrega, D. M. Teixeira, J. Amorim, L. M. M. Diniz, M. W. P. Barbosa, V. S. I. Giorgi, V. N. Pileggi, W. P. Martins (2016) Low versus atmospheric oxygen tension for embryo culture in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 106 (1): 95-104 e17.
- Orrenius, S., M. J. Burkitt, G. E. Kass, J. M. Dypbukt, P. Nicotera (1992) Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* 32 Suppl: S33-42.
- Otsuki, J., A. Okada, K. Morimoto, Y. Nagai, H. Kubo (2004) The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod* 19 (7): 1591-1597.
- Pabon, J. E., Jr., W. E. Findley, W. E. Gibbons (1989) The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril* 51 (5): 896-900.

- Quinn, P., G. M. Harlow (1978) The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J Exp Zool* 206 (1): 73-80.
- Rieger, D., N. M. Loskutoff, K. J. Betteridge (1992) Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev* 4 (5): 547-557.
- Schulz, K. F., D. G. Altman, D. Moher, Consort Group (2010) CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* 340:332.
- Scott, L. (2003) Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reprod Biomed Online* 6 (2): 201-214.
- Scott, L., R. Alvero, M. Leondires, B. Miller (2000) The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 15 (11): 2394-2403.
- Seli, E., C. G. Vergouw, H. Morita, L. Botros, P. Roos, C. B. Lambalk, N. Yamashita, O. Kato, D. Sakkas (2010) Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril* 94 (2): 535-542.
- Sengupta, J., L. Dhawan, P. G. Lalitkumar, D. Ghosh (2005) Nitric oxide in blastocyst implantation in the rhesus monkey. *Reproduction* 130 (3): 321-332.
- Sepulveda S, Steurer I, Gazzo E, Escudero E, Noriega L. (2011) Effect of oxygen conditions on the results of an oocyte donation program: A prospective randomized trial. *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida* 15(3): 32-33.
- Soini, J., C. Falschlehner, C. Liedert, J. Bernhardt, J. Vuoristo, P. Neubauer (2008) Norvaline is accumulated after a down-shift of oxygen in *Escherichia coli* W3110. *Microb Cell Fact* 7:30.
- Sturmey, R. G., D. R. Brison, H. J. Leese (2008) Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Assessing embryo viability by measurement of amino acid turnover. *Reprod Biomed Online* 17 (4): 486-496.
- Summers, M. C., J. D. Biggers (2003) Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update* 9 (6): 557-582.

- Šimunić i sur. (2012) Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost: medicinski pomognuta oplodnja. Školska knjiga, Zagreb
- Tarin, J. J. (1996) Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Mol Hum Reprod* 2 (10): 717-724.
- Tay, J. I., A. J. Rutherford, S. R. Killick, S. D. Maguiness, R. J. Partridge, H. J. Leese (1997) Human tubal fluid: production, nutrient composition and response to adrenergic agents. *Hum Reprod* 12 (11): 2451-2456.
- Telford, N. A., A. J. Watson, G. A. Schultz (1990) Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26 (1): 90-100.
- Trounson, A., D.K. Gardner (1993) Handbook of in vitro fertilization. CRC Press, Boca Raton
- Umaoka, Y., Y. Noda, K. Narimoto, T. Mori (1992) Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 31 (1): 28-33.
- Uyar, A., E. Seli (2014) Metabolomic assessment of embryo viability. *Semin Reprod Med* 32 (2): 141-152.
- Waldenstrom, U., A. B. Engstrom, D. Hellberg, S. Nilsson (2009) Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertil Steril* 91 (6): 2461-2465.
- Wale, P. L., D. K. Gardner (2012) Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development. *Biol Reprod* 87 (1): 24, 1-8.
- Yang, H. W., K. J. Hwang, H. C. Kwon, H. S. Kim, K. W. Choi, K. S. Oh (1998) Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 13 (4): 998-1002.
- Zhang, J. Q., X. L. Li, Y. Peng, X. Guo, B. C. Heng, G. Q. Tong (2010) Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod Biomed Online* 20 (4): 510-515.
- Zhao, Q., T. Yin, J. Peng, Y. Zou, J. Yang, A. Shen, J. H (2013) Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using a simple spectroscopy adjunct to morphology for embryo assessment in in vitro fertilization (IVF). *Int J Mol Sci* 14 (4): 6556-6570.

8. ŽIVOTOPIS AUTORA

Nina Gelo rođena je 31.08.1979. u Zagrebu. XVI. jezičnu gimnaziju završila je 1998.godine, a iste godine upisuje Prirodoslovno matematički fakultet u Zagrebu, smjer molekularna biologija koji završava 2005. Poslovni put započinje kao stručni suradnik u predstavništvu tvrtke Newport-Medical GmbH. 2007. godine počinje raditi na Odjelu za kliničku embriologiju Zavoda za humanu reprodukciju Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu gdje do danas radi kao klinički embriolog na pomognutoj oplodnji. Od 2017. godine voditelj je Odjela za kliničku embriologiju. Tijekom godina prošla je brojne stručne edukacije u inozemstvu od kojih su najvažnije one sa područja vitifikacije u klinici G.E.N.E.R.A. u Rimu i IVI Centru u Valenciji kao i tečaj biopsije zametaka te preimplantacijske dijagnostike (PGD) na Embryology and PGD Academy u Londonu. U 2014. godini prijavljuje prospektivnu randomiziranu studiju pri ANZCTR pod nazivom 'Effect of *in vitro* embryo culture conditions on metabolism of optimal human embryos in infertile couples'. Član je Hrvatskog društva kliničkih embriologa (HDKE), Hrvatskog društva biologa u zdravstvu (HDBUZ) te European Society of Human Reproduction and Embryology (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology). Kao uže područje interesa navodi metabolomiku, proteomiku, vitifikaciju, preimplantacijsku genetičku dijagnostiku te metode kriopohrane humanih gameta onkoloških bolesnika. Autor je 1 rada koji se citira u CC-u, 3 pismena i 2 usmena kongresna priopćenja kao i koautor 2 pismena kongresna priopćenja. Udana je majka dvoje djece.

9. PRILOZI

PRILOG 1: Popis kratica

AAP *engl. amino acid profile* – profil aminokiselina

Ala - alanin

AMP *engl. adenosine monophosphate* – adenzin monofosfat

ADP *engl. adenosine diphosphate* – adenzin difosfat

Arg - arginin

Asn - asparagin

Asp - aspartat

ATP *engl. adenosine triphosphate* – adenzin trifosfat

BMI *engl. body mass indeks* – indeks tjelesne mase

CFU *engl. colony forming unit* – broj kolonija

CID *engl. Collision Induced Dissociation* - kolizijom inducirana disocijacija

CLBR *engl. cumulative live birth rate* – kumulativna stopa živorođene djece

COC *engl. cumulus-oocyte complex* - kumulus-oocita kompleks

CPR *engl. clinical pregnancy rate*- stupanj kliničkih trudnoća

Cys - cistein

DET *engl. double embryo transfer* – embriotransfer dva zametka/blastociste

DNA *engl. deoxyribonucleic acid* – deoksiribonukleinska kiselina

ESI *engl. electrospray ionization* – ionizacija elektro - raspršivanjem

FR *engl. fertilization rate*- stupanj oplodnje

FSH *engl. follicle stimulating hormone*- folikul stimulirajući hormone

Gln - glutamin

Glu - glutamat

GMP *engl. Good Manufacturing Practice* – Dobra proizvođačka praksa

GnRH *engl. gonadotropin.releasing hormone-gonadotropin* - oslobađajući hormone

Gly - glicin

hCG *engl. human chorionic gonadotropin* - ljudski korionski gonadotropin

His - histidin

hMG *engl. human menopausal gonadotropin* - humani menopauzalni hormon

HPLC-MS/MS *engl. high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry* - metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti udružene s tandemskom spektrometrijom masa

ICM *engl. inner cell mass* – embrionalni čvorić

ICSI *engl. intracytoplasmic sperm injection* - intracitoplazmatska spermalna injekcija

Ile - izoleucin

IR *engl. implantation rate* - stupanj implantacije

IU *engl. international units* -internacionalne jedinice

IVF *engl. in vitro fertilization* - in vitro fertilizacija

LBR *engl. live birth rate* – postotak živorođene djece

LC-MS/MS *engl. liquid chromatography tandem mass spectrometry* - metoda tekućinske kromatografije udružene s tandemskom spektrometrijom masa

Leu - leucin

LLOQ *engl. Lower Limit of Quantitation* – donji limit kvantifikacije

Lys - lizin

Met - metionin

MRM *engl. Multiple Reaction Monitoring* - višestruko praćenje reakcija

Nle - norleucin

NO *engl. Nitric oxide* – dušikov monoksid

Nva - norvalin

Phe - fenilalanin

Pro - prolin

ROS *engl. reactive oxygen species* – reaktivni kisikovi radikali

RP-HPLC *engl. reversed phase high pressure liquid chromatography* - obrnuta faza tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Ser - serin

SET *engl. single embryotransfer* – embriotransfer jednog zametka/blastociste

SST *engl. System Suitability Test* - Test prikladnosti sustava

Thr - treonin

Trp - triptofan

Tyr - tirozin

UHPLC *engl. Ultra High Performance Liquid Chromatograph* - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

ULOQ *engl. Upper Limit of Quantitation* – gornji limit kvantifikacije

Val - valin