

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 22.12.2017. godine, broj 5940/14, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

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

kandidata dr Biljane Arsić, zaposlenoj u Ginekološko - akušerskoj Klinici „Narodni Front“ u Beogradu. Mentor je Prof. dr Eliana Garalejić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Mladenko Vailjević, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Snežana Vidaković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Aleksandra Trninić Pjević, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Biljane Arsić napisana je na ukupno 99 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 34 tabele, 19 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćena korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je istaknut globalni problem infertiliteta i evaluirana je njegova prevalenca. Definisano šta je procedura vantelesne oplodnje i dat je pregled istorijata ove procedure. Detaljno su opisani protokoli kontrolisanih ovarijalnih stimulacija, ultrazvučna evaluacija i procedura aspiracije jajnih ćelija. Istaknuto je koja se oprema koristi u IVF laboratoriji, njen značaj sa posebnim osvrtom na karakteristike inkubatora i medijuma. Na adekvatan način su u potpunosti opisani načini oplodjenja jajnih ćelija kao i procedura embrio transfera. Navedena

je podrška lutealne faze. Opisani su kako obustavljeni ciklusi tako i mogući ishodi vantelesnog oplodjenja.

Takođe, je prikazan detaljan osvrt na dosadašnja saznanja o razlikama u telesnoj težini novorođenčadi između dece nastale biomedicinski potpomognutim metodama i one nastale spontanom začećem. Prikazana su i dosadašnja saznanja o karakteristikama i uočenim patologijama posteljice u trudnoćama nastalim posle procedure vantelesne oplodnje.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja da li se razlikuju ishodi vantelesne oplodnje zavisno od vrste korišćenog inkubatora, vrste medijuma i njihovih kombinacija u toku postupka vantelesne oplodnje, da li se razlikuju telesne mase novorođenčadi zavisno od korišćenog inkubatora, vrste medijuma i njihovih kombinacija u toku postupka vantelesnog oplodjenja. Takođe, kao cilj rada navedena je da ukoliko se pokaže značajnost razlike u telesnoj masi novorođenčadi i u ishodima vantelesne oplodnje u odnosu na korišćene medijume i inkubatore, ispitati koji medijumi, inkubatori ili koja njihova kombinacija daje najbolji ishod VTO i optimalnu telesnu masu novorođenčadi.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studija preseka sprovedenoj na Odeljenju za arteficielne reproduktivne tehnologije (ART) Ginekološko-akušerske klinike "Narodni front". Detaljno su opisani svi kriterijumi i za uključivanje i svi kriterijumi za isključivanje parova iz procedure vantelesne oplodnje. Detaljno su opisani protokli kontrolisane ovarijalne stimulacije sa metodologijom hormonske i ultrazvučne evaluacije, načini završne maturacije oocita. Potom je detaljno opisan laboratorijski protokol sa posebnim osvrtom na karakteristike korišćenih medijuma i inkubatora. Pored metoda fertilizacije, načina njenog praćena opisani su i kriterijumi za određivanje kvaliteta embriona sa korišćenom klasifikacijom. Opisana je podrška lutealne faze. Analizirani su ishodi vantelesnog oplodjenja u zavisnosti od vrste korišćenih medijuma i vrste korišćenih inkubatora, odnosno njihove kombinacije, kao i njihov uticaj na telesnu težinu novorođenčadi. Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom i odobrena je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu, odluka broj 29/XI-1 od 09.11.2015. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključjenja u studiju. U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode. Testovi razlike korišćeni u ovoj studiji su parametarski (t-test, ANOVA) i neparametarski (Hi-kvadrat test, Kruskal-Wallis test). Za testiranje razlike između pojedinih grupa korišćena su naknadna testiranja sa Bonferroni korekcijom. Povezanost binarne ishodne varijable sa prediktorima je analizirana binarnom logističkom regresionom

analizom, dok je povezanost numeričke ishodne varijable sa ostalim prediktorima analizirana linearnom regresionom analizom. Svi rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 190 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Upoređivan je ishod vantelesnih oplodnji između grupa pacijentkija koje su koristile Heracell inkubator + Cook medijum (1134 pacijentkinje - 45,4% od ukupnog broja), grupe sa Heracell inkubatorom + Medicult medijumom (697 - 27,9%) i grupe sa K-Minc inkubatorom + Cook medijumom (667 - 26,7%). Postoji značajna razlika u ishodima vantelesnog oplođenja tj. biohemijskim, kliničkim i uznapredovalim trudnoćama između ispitivanih grupa, kao i u stopi fertilizacije i implantacije. Poređenjem među grupama je utvrđeno da u odnosu na stopu fertilizacije nema statistički značajne razlike između Heracell + Cook vs. Heracell+Medicult grupe ($p=0,647$), a postoji između Heracell+Cook vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$) i Heracell+Medicult vs. Kminc+Cook grupe ($p<0,001$). Takođe je utvrđeno da u odnosu na stopu biohemijskih trudnoća postoji statistički značajna razlika između Heracell + Cook vs. Heracell + Medicult grupe ($p=0,006$), a takođe, i između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook ($p=0,024$) i Heracell+Medicult vs. Kminc+Cook grupe ($p<0,001$). U ovoj studiji je utvrđeno da u odnosu na stopu kliničkih trudnoća postoji statistički značajna razlika između Heracell+Cook vs. Heracell+Medicult grupe ($p=0,003$), a takođe, i između Heracell+Cook vs. K-Minc + Cook ($p=0,027$) i Heracell + Medicult vs. K-Minc +Cook grupe ($p<0,001$). Takođe je utvrđeno da u odnosu na stopu implantacije nema statistički značajne razlike između Heracell + Cook vs. Heracell+Medicult grupe ($p=1,000$), a postoji između Heracell + Cook vs. K-Minc + Cook ($p<0,001$) i Heracell + Medicult vs. Kminc+Cook grupe ($p<0,001$). U odnosu na stopu uznapredovalih trudnoća postoji statistički značajna razlika između Heracell+Cook vs. Heracell+Medicult grupe ($p=0,033$), a takođe, i između Heracell+Cook vs. Kminc+Cook ($p=0,036$) i Heracell+Medicult vs. Kminc+Cook grupe ($p<0,001$). Korišćenjem logističkih regresionih modela sa kliničkom trudnoćom kao ishodom dobijeni su sledeći rezultati. Poređenje inkubatora sa Cook medijumom je pokazalo da je šansa da se dođe

do kliničke trudnoće za 41% veća ukoliko se radi o K-Minc inkubatoru u odnosu na Heracell. U narednom modelu uzete su samo pacijentkinje koje su u postupku vantelesnog oplođenja imale Heracell inkubator a komparirani su medijumi (Cook i Medicult). Pokazano je da je šansa da dođe do kliničke trudnoće je za 52% veća ukoliko se radi o Cook medijumu u odnosu na Medicult. Na osnovu rezultata finalnog modela, koji je poredi sve tri kombinacije inkubatora i medijuma, jasno je da je najbolja kombinacija za kliničku trudnoću kao ishod K-Minc + Cook, i da je za 42% veća šansa da dođe do kliničke trudnoće u odnosu na Heracell + Cook, odnosno skoro dva puta veća šansa u odnosu na Heracell + Medicult. Takodje su uradjeni logistički regresioni modeli sa porođajem kao ishodom. Poređenjem inkubatora sa Cook medijumom se vidi da je šansa da se rodi dete za 9.8% veća ukoliko se radi o K-Minc inkubatoru u odnosu na Heracell i ova šansa nije statistički značajna. U narednom modelu uzete su samo pacijentkinje koje su u postupku vantelesnog oplođenja imale Heracell inkubator a komparirani su medijumi (Cook i Medicult). Poređenjem medijuma kod Heracell inkubatora ustanovljeno je da je šansa da žena rodi dete je 42% veća ukoliko se radi o Cook medijumu u odnosu na Medicult. Poslednji model je model koji poredi sve tri kombinacije inkubatora i medijuma. Šansa da se rodi dete je manja za 28,9% ukoliko se radi o Heracell+Medicult u odnosu na Heracell+Cook i ova šansa je statistički značajna. Nasuprot tome, šansa da se rodi živo dete je 9,8% veća ukoliko se radi o K-Minc+Cook u odnosu na Heracell+Cook i ova šansa nije statistički značajna. Potom su izneti rezultati karakteristika novorođenčadi po ispitivanim grupama koji su pokazali da nema značajnih razlika između ispitivanih grupa po telesnoj masi i telesnoj dužini kod jednoplodnih trudnoća koje su završene u terminu porođaja. Generalizovani linearni model sa telesnom težinom novorođenčeta kao zavisnom i prediktorima koji su se značajno razlikovali između grupa u univarijantnoj analizi je pokazao da vrsta medijuma i vrsta inkubatora nema statistički značajan uticaj na telesnu masu novorođenčadi.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Do danas, nije publikovan nijedan rad koji je analizirao ove dve vrste medijuma i inkubatora kao i njihove kombinacije (Heracell + Cook, Heracell + Medicult i K-Minc + Cook) i njihov uticaj na ishod vantelesnog oplođenja, na telesnu težinu i dužinu terminske dece iz jednoplodnih trudnoća. Ishod procedure vantelesnog oplođenja visoko je zavisna od mnogih faktora. Pod tim faktorima se podrazumevaju karakteristike pacijenata, vrste protokola i medikamenata za kontrolisanu ovarijalnu hiperstimulaciju, karakteristike opreme za IVF laboratoriju, uslovi za kulturu tkiva, vrste medijuma i vrste kulture embriona. Ne postoji

jedinstven stav o efikasnosti različitih komercijalno dostupnih medijuma na ishod VTO, odnosno njihov uticaj na kvalitet embriona, stopu trudnoća i implantacije. I dok jedni smatraju da te razlike ne postoje (Staessen i sar., 1994, Mauri i sar., 2001, Zollner i sar., 2014), drugi pak smatraju da postoje razlike među različitim komercijalno dostupnim medijumima kada je u pitanju kvalitet embriona (Van Langendonck i sar., 2001, Aoki i sar., 2005, Sifer i sar., 2009). U ovoj disertaciji poredeći ishode trudnoća kada su korišćena dva različita medijuma za kulturu embriona u istoj vrsti inkubatora (Heracell) od kojih je Cook medijum bio sekvencijalni, a Medicult nije sekvencijalni utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u stopi fertilizacije i stopi implantacije, dok postoji značajna razlika u stopi kliničkih trudnoća, stopi uznapredovalih trudnoća i u stopi živorođene dece, te da se sekvencijalni medijum pokazao kao bolji. Nekoliko studija je ispitivalo efekte ISM1 i G-1TM v5 medijuma na kvalitet embriona i stopu implantacije. Morfologija embriona drugog i trećeg dana je bila signifikantno bolja kada su kultivisani u GIII medijumu, nego u ISM1 (Mauri AL i sar., 2001). Druga studija je pokazala da G1.2/G2.2 medijum bolji od Sydney IVF medijuma kada su embrioni transferisani 3. dan, dok su bili podjednako efikasni kada su embrioni transferisani u stadijumu blastociste (Van Langendonck A i sar., 2001). Ranija studija je pokazala statistički značajno veću stopu trudnoća i stopu kliničkih trudnoća u Vitrolife medijumu u odnosu na Cook medijum (Dumoulin JC i sar., 2010). Nasuprot tome druge studije su pokazale da ne postoji signifikantna razlika u kvalitetu embriona, stopi trudnoća i implantacionoj stopi između Irvine Scientific i IVF-50 Scandinavian IVF Science medijuma (Mauri AL i sar., 2001), Vitrolife i Medicult medijuma (Zollner K-P i sar., 2004), kao i Earle's medijuma i komercijalno dostupnog Menezo B2 medijuma (Staessen C i sar., 1994). U ovoj disertaciji nije dobijena statistički značajnu razliku u stopi vanmateričnih trudnoća, stopi pobačaja, prevremenih porođaja i terminskih porođaja između poređenih grupa. Međutim, Lin S i sar. (2015) su utvrdili da je učestalost vanmateričnih trudnoća povezana sa vrstom korišćenog medijuma (Lin S i sar., 2015).

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

primene niskih koncentracija kiseonika u poređenju sa konvencionalnim inkubatorima koji rade na atmosferskim koncentracijama kiseonika neke studije su utvrdile veću stopu implantacije, trudnoća, porođaja i živorođene dece (Waldenström U i sar., 2009, Catt JW i sar., 2000, Meintjes M i sar., 2009), dok druge studije nisu utvrdile postojanje pozitivnih efekata primene niskih koncentracija kiseonika na implantacionu stopu i stopu trudnoća (Kovacic B i sar., 2010, Dumoulin JC i sar., 1999, Kea B i sar., 2007, Bahceci M i sar., 2005). Sem koncentracija kiseonika kao mogućeg uzroka za bolje rezultate uočene u ovoj disertaciji i sama konstrukcija inkubatora može imati uticaj na ishod IVF-a, što je i pokazala studija Fujiwara M i sar. (2007) čija studija je pokazala da je u mini inkubatorima sa vratima na gore, nakon otvaranja vrata u trajanju od 5 sekundi, vreme neophodno za oporavak temperature i u komori i u posudi bilo 5 min, dok je kod konvencionalnih inkubatora sa vratima napred, nakon otvaranja vrata u trajanju od 5 sekundi, bilo potrebno 20 min da se oporavi temperatura u komori koja je nakon otvaranja vrata brzo pala na 36.4°C, a u posudi je bilo potrebno 30 min da se oporavi temperatura koja je bila pala na 36.7°C (Fujiwara M i sar., 2007). Razlika, u vremenu potrebnom da se oporavi koncentracija kiseonika posle otvaranja vrata između mini i konvencionalnih inkubatora, takodje je bila velika. Klinički rezultati su pokazali da je stopa dobrih embriona statistički značajno bila veća u mini inkubatorima. Činjenica da je veća stopa živorođene dece ukoliko su transferisani embrioni na dan 5 nakon kulture pri niskim koncentracijama kiseonika nego kada su transferisani embrioni iste starosti koji su kultivisani na atmosferskim koncentracijama kiseonika u konvencionalnim inkubatorima, govori u prilog stanovištu da atmosferske koncentracije kiseonika negativno utiču na kasnije stadijume razvoja embriona, tako što utiču na metabolizam embriona i razvoj blastociste.

Trudnoće iz IVF-a su povezane sa povećanim rizikom od prevremenog porođaja, rađanja dece sa niskom telesnom težinom, kongenitalnim anomalijama, perinatalnim mortalitetom, kao i drugih komplikacija vezanih za trudnoću (Fernando D i sar., 2012, Hayashi M i sar., 2012, D'Angelo D V i sar., 2012, Shih W i sar., 2008, Messerlian C i sar., 2013, Kalra SK i sar., 2012). Glavni razlog lošijeg neonatalnog ishoda trudnoća iz ART procedura je uglavnom nepoznat i najverovatnije je potencijalno multifaktorijalno uslovljen. Do sada je ograničen broj komercijalno dostupnih medijuma u tom smislu ispitivan, a dobijeni rezultati su kontraverzni. U ovoj studiji je pokazano da vrsta korišćenog medijuma, vrsta korišćenog inkubatora, kao i njihove kombinacije nisu imale uticaja na telesnu težinu i telesnu dužinu terminske novorođenčadi. Dumoulin i sar., (2010), Nelissen i sar., (2012), Wuder i sar., (2014) i Kleijkers i sar., (2014) su poredili Vitrolife i Cook medijum. Hassani i sar., (2013),

su sprovedli studiju poredeći Medicult and Vitrolife medium, dok su Eskild i sar., (2013), poredili Medicult Universal IVF, Medicult ISM1 i Vitrolife G-I PLUS. Ove studije su pokazale da vrsta korišćenog medijuma ima statistički značajan efekat na rani razvoj embriona, fetalni razvoj, kao i na telesnu težinu na rođenju. Međutim, Eaton i sar., (2012), su poredili GI.3, Global i GI.5 medium, Vergouw i sar., (2012) HTV i Sage, Lin i sar., (2013) GS TM, Global i Quinn's advantage, Carrasco i sar., (2013) MediCult, Cook i Vitrolife, Zhu i sar., (2014) Vitrolife, Global i Quinns, Lemmen i sar., (2014) su poredili Cook and Medicult i konačno Gu i sar. (2015) sprovedli poređenje između SAGE i Vitrolife i nasuprot prethodnoj grupi ove studije su pokazale da nema signifikantne povezanosti između vrste korišćenog medijuma i telesne težine na rođenju.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Arsic B, Perovic M, Medjo B, Macanovic B. Soldatovic I, Garalejic E.: Embryo Culture Medium Has No Significant Effect on Birth Weight and Length of in Vitro Fertilization Singletons. The Journal of Reproductive Medicine, 2017;62:598-604.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Procena uticaja različitih inkubatora i medijuma u toku postupka vantelesnog oplođenja na ishod trudnoće“ dr Biljane Arsić, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji, a ujedno i prvi rad uopšte koji je upoređivao korišćene kombinacije inkubatora i medijuma, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja vrste korišćenih inkubatora i medijuma na ishod vantelesnog oplođenja. Pokazano je da vrsta korišćenog medijuma nema uticaj na fertilizacionu i implantacionu stopu, ali ima uticaj na stopu biohemijskih, kliničkih, uznapredovalih trudnoća i stopu živorođene dece. Od velikog kliničkog značaja je saznanje da je šansa da dođe do kliničke trudnoće za 52% veća ukoliko se koristi Cook medijum u odnosu na Medicult, a da je šansa da pacijentkinje rode živo dete za 42% veća kada se koristi Cook medijum u odnosu na Medicult medijum. Šansa da dođe do kliničke trudnoće za 41% veća, a šansa da pacijentkinje rode živo dete je za 9,8% veća ukoliko se koristi K-Minc inkubator u odnosu na Haracell inkubator. Najbolja kombinacija za kliničku trudnoću je K-Minc + Cook, i ona daje za 42% veću šansu da dođe do kliničke

trudnoće u odnosu na Heracell + Cook, a skoro dva puta veću šansu u odnosu na Heracell + Medicult. Takođe je značajan doprinos za poboljšanje uspeha vantelesnog oplođenja i saznanje da je šansa da se rodi živo dete manja za 28,9% ukoliko se radi o Heracell+Medicult u odnosu na Heracell + Cook kombinaciju, a za 9,8% veća ukoliko se radi o K-Minc + Cook u odnosu na Heracell + Cook i ova šansa nije statistički značajna.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Biljane Arsić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 25.01.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Mladenko Vailjević

Prof. dr Snežana Vidaković

Prof. dr Aleksandra Trninić Pjević

Mentor:

Prof. dr Eliana Garalejić
