

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Sanja S. Medenica

**UTICAJ PRISUSTVA  
TIROID-PEROKSIDAZNIH ANTITELA  
NA ISHOD VANTELESNE OPLODNJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Sanja S. Medenica

**UTICAJ PRISUSTVA  
TIROID-PEROKSIDAZNIH ANTITELA  
NA ISHOD VANTELESNE OPLODNJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Sanja S. Medenica

**THE INFLUENCE OF THE PRESENCE OF  
THYROID PEROXIDASE ANTIBODIES  
ON *IN VITRO* FERTILIZATION OUTCOME**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

## PODACI O MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentor: Prof. dr Miloš Žarković, Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Klinički centar Srbije, Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma

Komentor: Prof. dr Eliana Garalejić, Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Ginekološko-akušerska klinika „Narodni front”

Članovi komisije:

Prof. dr Mladenko Vasiljević, Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Ginekološko-akušerska klinika „Narodni front”

Doc. dr Biljana Nedeljković Beleslin, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Klinički centar Srbije, Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma

Prof. dr Snežana Vujošević, Vanredni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet, Klinički centar Crne Gore, Interna klinika

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## ZAHVALNOST

Beskrajno hvala mojim profesorima, kolegama, roditeljima, sestri, prijateljima i svima koji su verovali u mene, bezgranično me podržavali i pomogli mi da istrajem u ostvarenju cilja.

*~Mojim roditeljima i sestri~*

## Rezime

Naslov: Uticaj prisustva tiroid-peroksidaznih antitela na ishod vantelesne oplodnje

Cilj: Iako postoje podaci koji povezuju tiroidnu autoimunost (TAI) i infertilitet, podaci koji se odnose na ishode vantelesne oplodnje (VTO) i markere TAI u folikularnoj tečnosti žena koje ulaze u program VTO su retki. Ciljevi studije su bili: ispitati prisustvo tiroidnih autoantitela u folikularnoj tečnosti kod pacijentkinja sa TAI, oceniti uticaj TAI na postizanje fertiliteta metodom VTO i proceniti povezanost nivoa tiroidnih autoantitela u folikularnoj tečnosti i ishoda VTO izraženog kao postignute trudnoće.

Metod: Studija je uključila 52 žene koje su ušle u program VTO (26 ispitanica sa TAI i 26 ispitanica kontrolne grupe bez TAI). Krv je uzorkovana pre početka protokola za kontrolisanu ovarijalnu stimulaciju, a u serumu su merene vrednosti tireotropina (TSH), slobodnog trijodtironina (fT<sub>3</sub>), slobodnog tiroksina (fT<sub>4</sub>), antitela na tiroidnu peroksidazu (anti TPO At) i antitela na tireoglobulin (anti Tg At). U folikularnoj tečnosti su merene vrednosti TSH, fT<sub>4</sub>, anti TPO At, anti Tg At i progesterona.

Rezultati: U trenutku ulaska u studiju sve pacijentkinje su bile nulipare, osim jedne koja je bila unipara. Sve pacijentkinje su imale primarni infertilitet, osim jedne sa sekundarnim infertilitetom. Prosečno trajanje infertiliteta bilo je duže u grupi pacijentkinja koje nemaju TAI (p=0,050). Naši rezultati su pokazali da su prosečne serumske vrednosti TSH (p=0,010) i fT<sub>3</sub> (p=0,001) bile značajno više, a prosečna serumska vrednost fT<sub>4</sub> (p=0,008) niža u TAI negativnoj grupi. TAI pozitivna grupa pacijentkinja je imala značajno više vrednosti anti TPO At i anti Tg At u serumu i folikularnoj tečnosti, u poređenju sa TAI negativnom grupom (p<0,001). Nije bilo značajnih razlika između grupa prema prosečnim vrednostima TSH i fT<sub>4</sub> u folikularnoj tečnosti. Pokazana je statistički značajna korelacija nivoa serumskih i anti TPO At u folikularnoj tečnosti (0,961, p<0,001 u grupi sa TAI; 0,438, p=0,025 u grupi bez TAI) i serumskih i anti Tg At u folikularnoj tečnosti (0,945, p<0,001 u grupi sa TAI; 0,554,

p=0,003 u grupi bez TAI). Stopa trudnoće po započetom ciklusu i embriotransferu značajno se razlikovala između grupe sa i bez TAI, (30,8% vs 61,5%), p=0,026 i (34,8% vs 66,7%), p=0,029, redom. Multivarijantna analiza je pokazala da žene sa TAI imaju manju šansu da ostvare trudnoću (p=0,004, OR=0,036, 95% IP 0,004-0,347). Pored TAI, pokazano je da su prethodna VTO, progesteron u folikularnoj tečnosti i protokol značajni i nezavisni prediktori ishoda VTO. Nije postojala statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima progesterona u folikularnoj tečnosti između grupe sa i bez TAI (21724,2±12157,3 ng/ml vs 20676,6±11764,9 ng/ml, p=0,754). Nije bilo statistički značajnih korelacija između progesterona u folikularnoj tečnosti i serumskih ili tiroidnih autoantitela u folikularnoj tečnosti u grupama. Ipak, pokazano je da je progesteron u folikularnoj tečnosti značajan prediktor ishoda VTO [log progesteron u folikularnoj tečnosti p=0,011, OR=56,276 (95% IP 2,542-1245,660)].

Zaključci: Tiroidna autoantitela su prisutna u folikularnoj tečnosti kod pacijentkinja sa TAI i ne generišu se u folikularnoj tečnosti, već prolaze krvno-folikularnu barijeru. Povišeni nivoi tiroidnih autoantitela u folikularnoj tečnosti žena sa TAI snažno koreliraju sa vrednostima istih u serumu i mogu uticati na postimplantacioni razvoj embriona. Po prvi put pokazano je da se koncentracije TSH i  $fT_4$  u folikularnoj tečnosti žena sa i bez TAI ne razlikuju. Takođe, po prvi put je pokazano prisustvo progesterona u folikularnoj tečnosti žena sa TAI koje su u programu VTO. Progesteron u folikularnoj tečnosti je nezavisan prediktor ishoda VTO, uzimajući u obzir TAI. Naši rezultati ukazuju na nižu stopu uspešnosti VTO u žena sa TAI, naglašavajući time važnost dijagnoze TAI kod žena sa infertilitetom.

Ključne reči: folikularna tečnost, tiroidna autoimunost, vantelesna oplodnja, infertilitet, progesteron

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Endokrinologija

UDK:



## Summary

Title: The influence of the presence of thyroid peroxidase antibodies on *in vitro* fertilization outcome

Objective: Although there are substantial data linking thyroid autoimmunity (TAI) and infertility, data regarding *in vitro* fertilization (IVF) outcomes and TAI markers in follicular fluid (FF) of women undergoing IVF are scarce. Objectives of the study were: to demonstrate the presence of thyroid autoantibodies in FF in patients with TAI, to estimate the effect of TAI on achieving fertility by IVF and to assess the association of the levels of thyroid autoantibodies in FF and IVF outcome expressed as the achieved pregnancies.

Methods: This study enrolled 52 women undergoing ART (26 TAI positive subjects and 26 TAI negative controls). Blood samples were drawn before the initiation of protocol for controlled ovarian stimulation, and thyrotropin (TSH), free triiodothyronine (fT<sub>3</sub>), free thyroxine (fT<sub>4</sub>), thyroid peroxidase antibodies (TPOAbs) and thyroglobulin antibodies (TgAbs) levels were measured. TSH, fT<sub>4</sub>, TPOAbs, TgAbs and progesterone (P4) levels were also measured in FF.

Results: At the time of enrollment, all patients were nullipara, except one which was unipara. All patients had primary infertility, except one patient with secondary infertility. The mean duration of infertility was longer in TAI negative group of patients ( $p=0.050$ ). Our results showed mean serum TSH ( $p=0.010$ ) and fT<sub>3</sub> ( $p=0.001$ ) levels were significantly higher, but mean serum fT<sub>4</sub> ( $p=0.008$ ) was lower in TAI negative group. TAI positive group of patients had significantly higher serum and FF TPOAbs and TgAbs levels, in comparison to TAI negative group ( $p<0.001$ ). There were no significant differences between the groups regarding mean levels of FF TSH and FF fT<sub>4</sub>. Statistically significant correlation was discovered regarding the levels of serum and FF TPOAbs (0.961,  $p<0.001$  in TAI positive; 0.438,  $p=0.025$  in TAI negative group) and TgAbs (0.945,  $p<0.001$  in TAI positive; 0.554,

p=0.003 in TAI negative group). Pregnancies rates per initiated cycle and per embryotransfer cycle were significantly different between TAI positive and TAI negative group, (30.8% vs 61.5%), p=0.026 and (34.8% vs 66.7%), p=0.029, respectively. Multivariate analysis showed that TAI positive women had less chance to achieve pregnancy (p=0.004, OR=0.036, 95% CI 0.004-0.347). Beside TAI, it was shown that FF P4, previous IVF and protocol are significant and independent IVF outcome predictors. There were no statistically significant differences in mean FF P4 levels between the group with and without TAI (21724.2±12157.3 ng/ml vs 20676.6±11764.9 ng/ml, p=0.754). There were no significant correlations between FF P4 and serum or FF thyroid autoantibodies in groups. However, it was shown that FF P4 is a significant predictor of IVF outcome [log FF P4 p=0.011, OR=56.276 (95% CI 2.542-1245.660)].

Conclusions: Thyroid autoantibodies are present in FF in women with TAI, and are not generated in FF, but cross blood-follicle barrier. Higher levels of thyroid autoantibodies in FF of TAI positive women are strongly correlated with serum levels and may have effect on the post-implantation embryo development. For the first time it was shown that concentrations of TSH and fT<sub>4</sub> in FF do not differ in women with and without TAI. FF P4 is independent predictor of IVF outcome, with respect to TAI. Our results indicate lower IVF success rate in women with TAI highlighting the importance of TAI diagnosis in women presenting with infertility.

Key words: follicular fluid, thyroid autoimmunity, in vitro fertilization, infertility, progesterone

Scientific area: Medicine

Uža naučna oblast: Endocrinology

UDK:

## SADRŽAJ

1. U V O D .....	1
1.1. Tiroidna funkcija i reprodukcija .....	2
1.1.1. Receptori tiroidnih i tireostimulišućeg hormona u reproduktivnom tkivu .....	3
1.1.2. Tiroidna funkcija u trudnoći .....	4
1.2. Tiroidna autoimunost .....	7
1.2.1. Hashimoto tiroiditis .....	12
1.3. Infertilitet .....	17
1.3.1. Infertilitet-definicija i incidenca .....	17
1.3.2. Infertilitet-podela i uzroci .....	18
1.3.3. Infertilitet-evaluacija infertiliteta i lečenje.....	19
1.4. Tiroidna autoimunost u reproduktivnom periodu-udruženost sa infertilitetom i neželjenim ishodima trudnoće .....	20
1.4.1. Tiroidna autoimunost i hipotiroidizam u trudnoći.....	24
1.4.2. Značaj folikularne tečnosti za kvalitet jajne ćelije.....	26
1.4.3. Tiroidna autoimunost i ishodi vantelesne oplodnje .....	28
1.5. Da li bi bio opravdan prekonceptijski skrining za tiroidna autoantitela?.....	30
2. CILJEVI RADA.....	33
3. METOD RADA.....	34
3.1. Vreme i mesto istraživanja.....	34
3.2. Ispitanici – jedinice posmatranja .....	34
3.3. Klinička metodologija.....	36
3.3.1. Serumske hormonske analize i tiroidna autoantitela .....	36
3.3.2. Kontrolisana ovarijalna stimulacija .....	37
3.3.3. Kultivacija jajnih ćelija, fertilizacija i embriotransfer .....	39

3.3.4. Podrška lutealne faze .....	42
3.3.5. Dizajn studijske populacije .....	42
3.3.6. Podaci uključni u analizu .....	43
3.3.7. Ishod vantelesne oplodnje.....	44
3.4. Statistička metodologija.....	44
4. REZULTATI.....	46
5. DISKUSIJA .....	98
6. ZAKLJUČAK.....	116
7. LITERATURA .....	117

## 1. U V O D

Infertilitet predstavlja ozbiljan zdravstveni i socijalni problem. Svake godine povećava se broj parova koji radi ostvarivanja trudnoće ulaze u program vantelesne oplodnje (VTO). U Srbiji 2000 parova godišnje ulazi u program VTO. Imajući u vidu da trudnoća uzrokuje niz hormonalnih promena, ali i dodatnih metaboličkih zahteva, za očekivati je da će se poremećaji tiroidne funkcije često manifestovati upravo tokom gestacionog perioda. Podaci iz literature upućuju da tiroidna autoimunost (TAI) različito utiče na ishode VTO, vodeći porastu rizika za nemogućnost začeca, probleme u održavanju trudnoće i veću učestalost komplikacija trudnoće, a na koje se i pored pokušaja primene izvesnih terapijskih mera (supstitucija levotiroksinom, primena imunoglobulina, heparina/acetilsalicilne kiseline) ne uspeva delovati. Razlozi neuspeha VTO kod žena sa TAI mogu biti oštećen celularni i humoralni imuni odgovor, suptilan nedostatak tiroidnih hormona (TH) ili nemogućnost žlezde da se adaptira na povišen nivo estrogena, ovarijalnu stimulaciju ili trudnoću. Eksperimentalni podaci, dobijeni u studijama na animalnom modelu, pokazuju da tiroidna autoantitela utiču na fertilizaciju jajnih ćelija i razvoj embriona. Folikularna tečnost obezbeđuje značajnu mikrosredinu za razvoj i kvalitet jajnih ćelija. Prisustvo tiroidnih autoantitela bi moglo da ometa sazrevanje jajnih ćelija u folikularnoj tečnosti, da nepovoljno utiče na njihov kvalitet, a u sadejstvu sa sveukupno izmenjenim humoralnim i celularnim imunim odgovorom delujući na receptivni endometrijum i implantaciju embriona, da smanji uspešnost metoda VTO.

Rezultati dosadašnjih istraživanja u svetu još uvek nisu dali precizne molekularne mehanizme putem kojih tiroidna autoantitela utiču na fertilitet. Imajući u vidu prethodno navedeno, rasvetljavanje ovog problema bi pomoglo u povećanju stope uspešnosti metoda VTO, ali i razvijanju novih terapijskih mogućnosti.

## 1.1. Tiroidna funkcija i reprodukcija

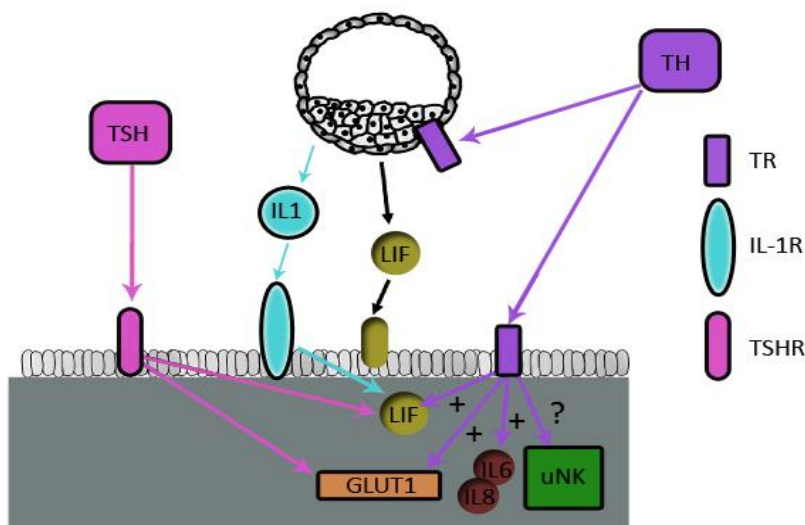
Održavanje adekvatne tiroidne funkcije postiže se mehanizmom negativne povratne sprege. U paraventrikularnom jedru hipotalamusa sintetise se tireotropin oslobađajući hormon (TRH), koji reguliše sekreciju tireotropina (sinonim tireostimulišući hormon, TSH) iz ćelija prednjeg režnja hipofize. TSH podstiče rast folikularnih ćelija i stimuliše proizvodnju i sekreciju TH, koji mehanizmom negativne povratne sprege inhibišu sekreciju TRH i TSH. TSH je veoma osetljiv i specifičan marker regulacije rada tiroidne žlezde i predstavlja *set-point* tiroidne osovine. TH potiču od tireoglobulina (Tg), a za njihovu sintezu neophodno je prisustvo joda,  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  simportera (NIS) i tiroidne peroksidaze (TPO). NIS omogućava preuzimanje joda, a smešten je na bazolateralnoj membrani tiroidnih folikularnih ćelija. TPO katalizuje oksidaciju joda i jodinaciju tirozinskih partikula Tg u tiroidnoj žlezdi, nakon ulaska joda u tiroidnu žlezdu i transporta istog do apikalne membrane tiroidne folikularne ćelije, a uz prisustvo vodonik-peroksida. Reaktivni atom joda se pridodaje tirozinskim ostacima Tg-a, koji se spajaju etarskom vezom pod dejstvom TPO, da bi se potom iz Tg u lizozomima tiroidne ćelije oslobodili tiroksin ( $\text{T}_4$ ) i trijodtironin ( $\text{T}_3$ ), u odnosu 20:1, koji svoje dejstvo ostvaruju preko nukleusnih receptora. Nespojjeni mono- i dijodtirozin dejdinišu pod dejstvom jodotirozin dejdinaze, čime se omogućava reciklaža neiskorišćenog joda.  $\text{T}_4$  se konvertuje u potentniji  $\text{T}_3$  delovanjem enzima jodotironin dejdinaza (D1, D2, D3). D1 je zastupljena u ćelijama tiroidne žlezde, jetri i bubrezima. D2 poseduje veći afinitet za  $\text{T}_4$ , a nalazi se u hipofizi, mozgu, mrkom masnom tkivu, srcu, skeletnim mišićima i tiroidnoj žlezdi, dok D3 inaktivise TH do dijodtironina ( $\text{T}_2$ ) i reverznog  $\text{T}_3$  ( $\text{rT}_3$ ), a nalazi se u fetalnom tkivu, placenti i mozgu, izuzimajući hipofizu (1).

Očuvana ili pak, adekvatno regulisana tiroidna funkcija je značajna za začeće, implantaciju embriona i održavanje trudnoće.

### 1.1.1. Receptori tiroidnih i tireostimulišućeg hormona u reproduktivnom tkivu

*In vitro* studije pokazuju da TH direktno deluju na rani razvoj placente, stimulišu angiogenezu i promociju invazije i diferencijacije embionalnih ćelija. Humani endometrijum pokazuje ekspresiju tiroidnih receptora (TR)  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  i receptora za TSH (TSHR), a ista je najizraženija na receptivnom endometriju (2,3). Publikacije upućuju da bi endometrijum mogao biti mesto ekstratiroidne produkcije TH (4), za šta je neophodno prisustvo TPO i Tg. Prisustvo TH je pokazano u i folikularnoj tečnosti, esencijalnoj mikrosredini za razvoj jajne ćelije, a TR su prisutni na ćelijama granuloze, ali i primordijalnim, primarnim i sekundarnim folikulima (2,5). Zreli MII oociti (II faza mejoze), takođe ekspresuju TSHR, TR $\alpha 1$  i TR $\beta 1$  i vrlo je verovatno da u sadejstvu sa D2 i D3, dolazi po periferne konverzije TH na ovarijalnom tkivu, čime se objašnjava direktan efekat T<sub>3</sub> na jajne ćelije (5,6) i granuloza ćelije u sadejstvu sa folikulostimulišućim hormonom (FSH), ali i na razvoj placente delujući preko faktora rasta, posebno epidermalnog faktora rast (*epidermal growth factor*, EGF). Zato ne iznenađuje uticaj folikularne tečnosti u adekvatnoj folikulogenezi, jer potencijalni hormonski disbalans, dovodi do neuspeha folikulogeneze, izmene u broju, obliku, veličini jajnih ćelija (7) i sledstveno do neuspeha fertilizacije, ne samo u začecu prirodnim putem, nego i začecu putem *in vitro* fertilizacije (IVF). Ekspresija TR $\alpha 1$ , TR $\beta 1$ , TR $\alpha 2$  povećava se sa starenjem gestacije, a nishodna regulacija istih se zapaža u viloznom trofoblastnom i deciduallnom tkivu u spontanim i rekurentnim pobačajima (8).

TSH deli signalne puteve i pretpostavlja se da utiče na ekspresiju drugih parakrinih faktora i njihovih receptora kao što su leukemija inhibišući faktor (LIF), leptin (Slika 1.), koji su od velikog značaja za uspešnu implantaciju embriona (3,9,10).



*Slika 1. Značaj tiroidne žlezde u regulaciji parakrinih faktora značajnih za implantaciju embriona Prema Stavreus Evers, ref (2)*

TH-tiroidni hormoni; TR-tiroidni receptor; TSHR-receptor za tireostimulišući hormon; IL1-interleukin 1; IL6-interleukin 6; IL8-interleukin 8; IL-1R-receptor za interleukin 1; LIF-leukemija inhibišući faktor; GLUT1-glukozni transporter 1; uNK-uterusne *Natural Killer* ćelije.

### 1.1.2. Tiroidna funkcija u trudnoći

Fiziologija tiroidne žlezde u trudnoći je izmenjena. Trudnoća uzrokuje dodatne metaboličke zahteve i hormonske izmene.

Među najvažnijim nalaze se dodatne potrebe za jodom koje proizilaze iz povećanog renalnog klirensa istog, usled povećanja renalnog protoka i glomerulske filtracije koji se dešavaju u trudnoći (11,12). Uz to, nakon prvog trimestra, povećava se transplacentalni transport joda potreban za aktivnost jodotironin sintetaze u cilju produkcije fetalnih TH (13). Ipak, u jod-suficijentnim područjima navedeni uobičajeni metabolički zahtevi ne predstavljaju problem, jer ih nadoknađuju intratiroidni depoi joda. Međutim, u jod-deficijentnim područjima, neophodno je zadovoljiti dnevne potrebe joda, prema preporukama Svetske zdravstvene organizacije (SZO) (Tabela 1.) (14), jer u suprotnom dolazi po povećanja volumena tiroidne žlezde u majke, ali i u



fetusa. Najbolji parameter kontrole adekvatne nadoknade joda je urinarna ekskrecija (15).

*Tabela 1. Preporučeni unos joda tokom trudnoće i kategorizacija nutritivnih potreba zasnovana na urinarnoj ekskreciji joda (Adaptirano iz Andersson, ref.13)*

<b>Populaciona grupa</b>	<b>Srednja koncentracija joda u urinu</b>	<b>Kategorije unosa joda</b>
<b>Trudnice</b>	< 150 µg/l	Nedovoljan
	150 – 249 µg/L	Adekvatan
	250 – 499 µg/L	Povišen
	> 500 µg/L	Prekomeran

Promene u volumenu tiroidne žlezde u jod-suficijentnim područjima u Evropi su minimalne, oko 10-15%, dok u sredinama koje su nedovoljno bogate jodom, uvećanje promera tiroidne žlezde se kreće čak oko 20-35% do udvostručavanja u periodu od prvog trimestra do kraja trudnoće (16). Volumen tiroidne žlezde pozitivno korelira sa ukupnom količinom tečnosti u organizmu (17), a razlog povećanog volumena žlezde može biti i ubrzan protok krvi (18). Promene u volumenu žlezde prati i porast Tg.

Humani horionski gonadotropin (hCG) je glikoproteinski hormon koga luče ćelije sinciotrofoblasta, spoljašnjeg omotača blastociste koja nastaje posle oplodnje jajne ćelije i implantacije embriona. hCG stimuliše stvaranje progesterona od strane luteinizirajućeg tela. Vaskularnost između trofoblasta (ćelija embriona) i zida materice je takođe poboljšana pod dejstvom ovog hormona. Nakon 3-5 dana po implantaciji embriona moguće je detektovati hCG, koji se nadalje duplira svaka dva dana tokom normalne trudnoće, smanjuje se od 8. do 10. nedelje trudnoće, ali njegov nivo ostaje povišen tokom cele trudnoće. Njegova struktura sličnost sa strukturom TSH je u beta subjediniči, čime se veruje, obezbeđuje i njegova direktna aktivnost u smislu promocije rasta tirociti (19). Tokom trudnoće ostvaruje direktan stimulatorni efekat na tirociti,

uzrokujući tranzijentno povišenje koncentracije slobodne frakcije tiroksina (fT<sub>4</sub>) uz delimičnu supresiju TSH sa pikom aktivnosti pred kraj prvog trimestra (11,19). Potentnost hCG-a je 1/104 potentnosti TSH, što je i razlog zašto, u uslovima normalne trudnoće, ovaj efekat ostaje neprimećen.

Tokom trudnoće dolazi do porasta serumskih koncentracija tiroksin vezujućeg globulina (*thyroxine binding globulin*, TBG) što uzrokuje sledstveni porast koncentracije totalnog T<sub>4</sub> i totalnog T<sub>3</sub>. (16). Biosinteza TBG raste s jedne strane estrogen zavisnom indukcijom uzrokujući porast sijalinske frakcije TBG (20), a sa druge strane redukcijom plazma klirensa, tako da između 16. i 20. nedelje dostiže dvostruke vrednosti (16). Dok TBG raste, zapaža se lak pad u koncentraciji transtiretina i albumina. Međutim, u normalnoj trudnoći, ove promene su bez većeg kliničkog značaja i serumske vrednosti TBG-a se normalizuju 4-6 nedelja po porođaju.

Produkcija D3 u placenti, enzima koji konvertuje T<sub>4</sub> u T<sub>3</sub> i T<sub>3</sub> u T<sub>2</sub>, može biti još jedan od razloga porasta serumskih totalnih vrednosti TH. Tokom drugog i trećeg trimestra, sa istovremenim snižavanjem hCG-a, vrednost TSH raste i dostiže najviše vrednosti u poslednjem trimestru (21), dok se fT<sub>4</sub> snižava, a može se naći i porast reverznog T<sub>3</sub>. S obzirom da komercijalni testovi nisu optimalni za određivanje koncentracije fT<sub>4</sub> tokom trudnoće, TSH je najbolji marker tiroidne funkcije u drugom i trećem trimestru.

Prvobitne studije kod trudnica su ukazivale na gornju referentnu granicu TSH 2,5 mIU/l u prvom i 3,0 mIU/l u drugom i trećem trimestru, a u donju referentnu granicu 0,1 mIU/l, potom 0,2 mIU/l i 0,3 mIU/l redom u drugom i trećem trimestru (22). Međutim, skorašnje studije ukazuju na manje sniženje gornje referentne granice u odnosu na vrednosti van trudnoće, obično ne pre 7. nedelje gestacije, kao i na činjenicu da iako je pomeranje nadole TSH referentnog opsega prisutno u svim populacijama, ono znatno varira između različitih rasnih i etničkih grupa. Smanjenje donje referentne granice TSH je za oko 0,1-0,2 mU/L, a gornje referentne granice za oko 0,5-1,0 mU/L u odnosu na referentne vrednosti van trudnoće. Smanjenje donje referentne granice tokom trudnoće zapaža se u gotovo svim studijama. U malom procentu žena, TSH može biti nedetektabilan (<0,01 mU/L), a ipak predstavljaju normalnu trudnoću (23).

Produkcija fetalnih TH se ne dešava pre 8. do 10. nedelje gestacije, a do tada placenta reguliše prolaz TH od majke do fetusa putem transportnih proteina, TBG, dejodinaza, a hCG i oksitocin omogućavaju adekvatno snabdevanje fetusa jodom (24,25).

## 1.2. Tiroidna autoimunost

Autoimunost je u osnovi poremećaj imunološke tolerancije na sopstvene antigene. Dve najčešće kliničke prezentacije autoimune tiroidne bolesti su Graves-ova bolest i Hashimoto tiroiditis (HT).

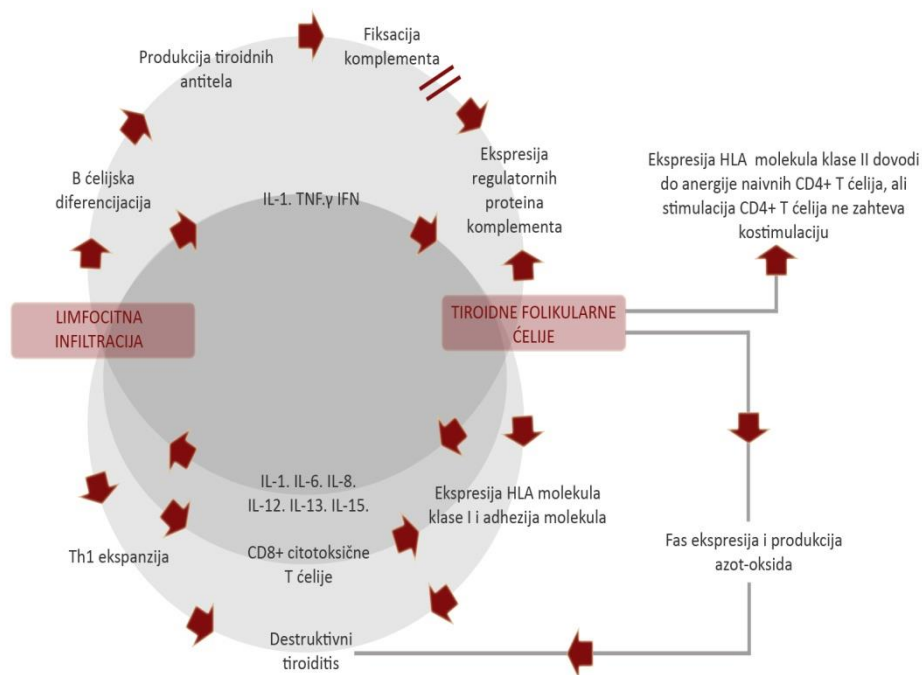
Glavni antigeni u razvoju TAI su: Tg, TPO i TSHR (26), dok su ređe zastupljeni antigeni NIS i druge komponente tiroidne ćelije.

Tg je veliki jonizovani, glikozilisani protein, od 670 kDa, koji se sintetiše u tiroidnim ćelijama. Tg omogućava sintezu T<sub>3</sub> i T<sub>4</sub>. Naime, oko 70% jodida u Tg je u inaktivnom obliku kao mono- i dijodtirozin. Preostalih 30% jodida potiče od T<sub>3</sub> i T<sub>4</sub> koji se oslobađaju aktivnošću fosforilaze i drugih kiselih proteaza i peptidaza, pod uticajem TSH stimulacije. U humoralnom autoimunom odgovoru uključeno je 4 od 6 B ćelijskih epitopa Tg-a. *In vitro* studije upućuje da se mora prevazići inicijalna tolerancija na dominantne epitope da bi se mogla razviti autoimunost na Tg (27). Shodno animalnim istraživanjima pretpostavlja se da bi Tg T ćelijski epitop, označen kao Tg.2098, mogao biti uključen u patogenezu inicijalnog autoimunog odgovora (28,29). Tg se primarno koristi kao marker za praćenje efektivnosti tretmana diferentovanog tiroidnog karcinoma i recidiva bolesti nakon operacije. Zastupljenost anti Tg antitela (anti Tg At) je u oko 70% HT, 60% idiopatskog hipotireoidizma, 30% Graves-ove bolesti, u manjem broju kod tiroidnog karcinoma i u 3% zdravih individua (30,31). Ova antitela ne vezuju komplement, ali učestvuju u antitelima posredovanoj citotoksičnosti putem ćelija prirodnih ubica (*natural killer, NK*).

TPO, nekada označen kao mikrozomalni ili M antigen, je glikoprotein od 105 kDa, lokalizovan na površini tiroidnih ćelija, kao i u citoplazmi, predstavlja antigen uključen u komplementom posredovanu citotoksičnost, kao i antitelima posredovanu ćelijsku

citotoksičnost (32). Epitopi koje prepoznaju antitela mogli bi biti genski determinisani, pa se poseban značaj poklanja TPO epitopima koje prepoznaju T ćelije pacijenata sa tiroidnom autoimunom bolešću, uz verovatnoću da se obrazac prepoznavanja epitopa razlikuje među osobama sa autoimunim hipotiroidizmom i onih koji su eutiroidni sa pozitivnim tiroidnim autoantitelima. Time bi se mogle odrediti one osobe iz grupe eutiroidnih sa pozitivnim tiroidnim autoantitelima, koje imaju veću verovatnoću da iz eutiroidnog stanja razviju hipotiroidizam. Anti TPO antitela (anti TPO At) najzastupljenija su antitiroidna antitela, prisutna u oko 90% kod HT, 75% Graves-ove bolesti i kod 10-20% nodularne strume i tiroidnog karcinoma, ali i u 10-15% zdravih individua (33).

Pored humoralog imuniteta i produkcije antitiroidnih antitela od strane B limfocita, ćelijski imunitet i imuni kompleksi imaju značajnu ulogu u razvoju autoimune tiroidne bolesti, mada se veruje da je značaj poslednjih u patogenezi iste minimalan. U početnim stadijumima bolesti T ćelijski odgovor je ograničen, ali sa razvojem bolesti se povećava (34), uključujući specifične Tg i TPO epitope i aktivaciju klaster diferencijacije (*cluster of differentiation*, CD) 8+ T ćelija usmerenih na te epitope, koje se mogu naći čak do 9% u perifernoj krvi pacijenata sa dugogodišnjim hroničnim tiroiditisom (35). Pored antigenima stimulisane, opisana je i direktna T ćelijska citotoksičnost. Značaj imunih kompleksa je prepoznat u smislu oslobađanja citokina i drugih proinflamatornih medijatora (Slika 2). Tiroidne ćelije pod dejstvom citokina, koji aktiviraju Fas i Fas ligand, podležu apoptozi.



*Slika 2. Autoimuna tiroidna bolest-interakcije tiroidnih ćelija i imunog sistema. Prema Weetman, ref. (36)*

IL1-interleukin 1; IL6-interleukin 6; IL8-interleukin 8; IL12-interleukin 12; IL13-interleukin 13; IL15-interleukin 15; Th1-T helper 1 ćelije, TNF-tumor necrosis factor,  $\gamma$ -IFN-interferon gamma, HLA-human leucocyte antigen, CD8+ citotoksične T ćelije- cluster of differentiation 8+ citotoksične T ćelije; CD4+ T ćelije- cluster of differentiation 4+ T ćelije

Raspravlja se o brojnim objašnjenjima za nastanak autoimunosti, ali se pojedini izdvajaju (26)

1. Destrukcija ćelija ili virusna infekcija vode abnormalnoj prezentaciji antigena i oslobađanju brojnih antigena ili ćelijskih fragmenata lokalno u limfatike, prevazilazeći na taj način uobičajeni mehanizam tolerancije
2. Abnormalni antigeni, ako što su degradirani ili denaturisani protein, mogu se oslobađati iz maligne ćelije ili virusom zahvaćene ćelije
3. Imunski odgovor na sopstveni antigen može biti indukovano epitopom bakterije ili virusa identične konformacije kao sopstveni antigen

4. Somatska mutacija gena T ćelijskog receptora može voditi klonu samoreaktivnih ćelija, mada se retko dešava i nije opisana u autoimunim bolestima
5. Nasleđivanje specifičnih HLA, T ćelijskog receptora ili drugih gena koji kodiraju proteine koji imaju naročito efikasnu sposobnost da obraduju ili prezentuju antigen
6. Nasledni ili faktori sredine koji dovode do nastanka aberantnih T i B ćelijskih povratnih kontrolnih mehanizama
7. Izostanak klonalne delecije može voditi opstanku samoreaktivnih T ćelija.
8. Izostanak normalne maturacije imunog sistema dozvoljava fetalnim T i B ćelijama da ostanu autoreaktivne i kao takve dugo perzistiraju
9. Poliklonalna aktivacija T ili B ćelija, nepoznatim stimulusom, vodi produkciji samoreaktivnih B ćelijih imunoglobulina, u odsustvu antigenskog stimulusa
10. Tiroidne epitelne ćelije eksprimiraju sistem leukocitnih antigena (*human leukocyte antigen*, HLA) II molekule i mogu funkcionisati kao antigen prezentujuće ćelije
11. Uticaj faktora okruženja

Razvoj autoimune tiroidne bolesti, pretpostavlja se, prolazi nekoliko stadijuma (26).

**Stadijum 1** - početno stanje. Normalna izloženost antigenima kao što je Tg i odgovor u vidu niskog titra antitela, uz naslednu podložnost putem HLA-DR, DQ ili drugih gena.

**Stadijum 2a** - inicijalno oštećenje tiroidne žlezde i niska stopa imunog odgovora. Tu spadaju virusna ili druga oštećenja sa oslobađanjem normalnih ili izmenjenih Tg, TPO, TSHR, zatim povećan titar antitela kod osoba genetski podložnih putem HLA-DR, DQ ili drugih gena, infekcijom uzrokovan porast interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- $\gamma$ , koji dovode do specifične ili nespecifične antigenske stimulacije T pomažućih (*helper*, Th) ćelija, stimulacije DR ekspresije i aktivacije NK ćelija, glikokortikoidima uzrokovana izmena limfocitne funkcije tokom stresa.

**Stadijum 2b** - spontana regresija imunog odgovora.

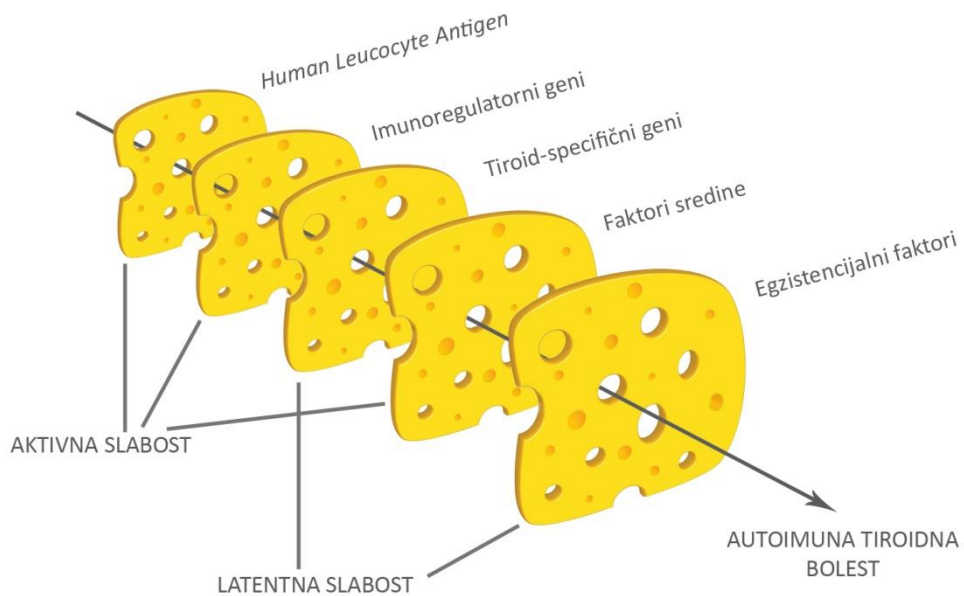
**Stadijum 3** - antigenima uzrokovano oštećenje tiroidne ćelije (ili stimulacija). Ukoliko supresivni faktori ne stave imuni odgovor pod kontrolom, bolest postaje klinički manifestna. Glavnu ulogu ovom stadijumu imaju direktna T ćelijska citoliza ili apoptoza, antitelo-zavisna ćelijska citotoksičnost i NK ćelije.

**Stadijum 4** - dodatni faktori koji se javljaju tokom razvoja bolesti, a povećavaju antitiroidnu imunoreaktivnost. Svaki stimulus koji utiče na ekspresiju DR na tiroidnim ćelijama može da utiču da tiroidne epitelne ćelije funkcionišu kao antigen prezentujuće ćelije.

**Stadijum 5** - antigen nezavisna progresija bolesti, zahvaljujući nespecifičnom autoreaktivnom imunom procesu.

**Stadijum 6** - klonalna ekspanzija sa razvojem udruženih bolesti. Povećanjem prisustva T i B aktiviranih ćelija, produkcijom citokina, prisustvom autoreaktivnih i antigen nespecifičnih T ćelija u tiroidnom tkivu, nastavlja se ćelijska destrukcija sa oslobađanjem novih antigena, sa razvojem novih imunoloških sindroma.

Najbolje predstavljen model u kome je podeljena uloga potencijalnim aktivirajućim faktorima bolesti u stadijume naglašavajući predisponirajuće događaje, odgovore indukovane antigenima, ali i sekundarne i nespecifične odgovore koji se događaju tokom razvoja bolesti, je model 'Švajcarskog sira' (Slika 3.) (26,37).



Slika 3. Model 'Švajcarskog sira' koji prikazuje kumulativni efekat uzročnika u razvoju autoimune tiroidne bolesti. Prema Weetman, ref.(37)

### 1.2.1. Hashimoto tiroiditis

HT je jedan od najčešćih sindroma TAI. Naziv datira još od 1912.godine kada je dr Hakaru Hashimoto opisao 4 pacijenta sa hroničnim oboljenjem tiroidne žlezde, koje ja nazvao *struma lymphomatosa*. Postoje i brojni sinonimi kao što su hronični tiroiditis, limfocitni tiroiditis, limfadenoidna struma, a u skorije vreme i autoimuni tiroiditis.

#### 1.2.1.1. Hashimoto tiroiditis-etiologija i patogeneza

Etiološki činioci, posebno oni koji inicijalno uzrokuju bolest, nisu u potpunosti razjašnjeni. Pretpostavlja se da je varijanta HT sa strumom udružena sa nasleđivanjem



HLA-DR5, a atrofijski oblik sa HLA-DR3. Pacijenti imaju antitela na brojne tiroidne antigene. Najčešće se nalaze anti Tg At, anti TPO At i TSHR blokirajuća At usmerena na TSHR, dok se kod 10-15% pacijenta ne mogu naći At, a kod nekih se mogu naći i tiroid-stimulišuća i citotoksična antitela. Serum pacijenata sa HT obično poseduje visoku citotoksičnu aktivnost (38), a antitela koja ima ulogu u antitelima posredovanoj citotoksičnoj aktivnosti su ona usmerena na Tg i TPO antigene (26,39). T-ćelijski posredovana imunost u tiroiditisu uzrokuje prvo pojavu strume sa limfocitnom infiltracijom i kompenzatornom hiperplazijom tiroidnih ćelija, a potom postepenu smrt ćelija i atrofiju žlezde. Kao jedan od glavnih kliničkih sindroma TAI, pretpostavljeni patogenetski mehanizam je prethodno opisan. Značajnu ulogu u patogenezi HT, pored navedenog, ima povećana diferencijacija Th17 i pojačana citokina IL-17. Na osnovu prisustva imunoglobulina G<sub>4</sub> (IgG<sub>4</sub>), HT se deli na grupu koja je bogata IgG<sub>4</sub> pozitivnim plazma ćelijama i drugu koja je siromašna u njihovom broju (40). Prvi oblik je klinički povezan sa manjim odnosom zatupljenosti bolesti u žena u odnosu na muškarce, bržom progresijom bolesti, subkliničkim hipotiroidizmom (SCH), difuzno niskom hipohogenošću parenhima i visokim nivoom tiroidnim autoantitela.

*Riedel* tiroiditis, koji spada u grupu bolesti povezanih sa IgG<sub>4</sub>, je retka forma hroničnog tiroiditisa karakterisana inflamatornom proliferativnom fibrozom koja zahvata tiroidni parenhim, ali i strukture u blizini.

#### **1.2.1.2. Hashimoto tiroiditis- incidenca, distribucija i prognoza**

Iako, deficijencija joda ostaje najčešći razlog hipotiroidizma, HT je najčešći uzrok spontanog hipotiroidizma u područjima sa adekvatnim unosom joda, sa godišnjom incidencom u svetu od 0,3-1,5 slučajeva na 1000 osoba (40), 10-15 puta češće kod žena, u periodu od 30-te do 50-te godine života, a kod muškaraca sa pikom 10-15 godina kasnije.

Prognoza bolesti je odlična, ukoliko se blagovremeno uvede supstitucija levotiroksinom u odgovarajućoj dozi, u stanju kada destrukcija tireocita napreduje do

razvoja hipotiroidizma (41) (Tabela 2). Nelečenje ili nedovoljna supstitucionalna doza može dovesti do poremećaja metabolizma lipida sa povećanom incidencijom koronarne arterijske bolesti, anemijskog sindroma, izmene jačine glomerulske filtracije, eventualno povišenih vrednosti keratin kinaze i prolaktina, a kao krajnji fatalan ishod, najčešće nelečene hipotireoze na bazi HT, može se razviti miksedemska koma. Nasuprot tome, neadekvatno visoka doza leka može biti razlog smanjenja koštane gustine do razvoja osteoporoze, kao i poremećaja srčanog ritma. Na terenu HT je povećan rizik za razvoj tiroidnog karcinoma (42), posebno papilarnog.

*Tabela 2. Simptomi i klinička manifestacija hipotiroidizma različite učestalosti*

<b>Hipotiroidizam-simptomi i klinička prezentacija</b>	
Simptomi	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ suva koža, smanjeno znojenje, gubitak kose, krti i lomljivi nokti, zamor, slabost, dispnoja, slabiji apetit, dobijanje u telesnoj masi, nepodnošenje hladnoće, promukao i grub glas, opstipacija, poremećaji pamćenja i koncentracije, oslabljen sluh, smanjen libido, poremećaj menstrualnog ciklusa</li> </ul>
Klinička manifestacija	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ suva i hrapava koža, alopecija i gubitak spoljne trećine obrva, otok lica, bledilo uz žućkastu prebojenost čela, otok šaka i stopala, pretibijalni otoci, dermopatija, gojaznost, bradikardija, hipertenzija posebno dijastolna, efuzije u serozne šupljine, infertilitet, galaktoreja, moguć <i>sleep apnea</i> sindrom, sindrom karpalnog tunela, produženo vreme relaksacije tetivnih refleksa, pseudomiotonija, psihijatrijski problemi, Hashimoto encefalopatija</li> </ul>

### **1.2.1.3. Hashimoto tiroiditis- klinička prezentacija i tok bolesti**

Tok HT je individualan i promenljiv, počev od asimptomatskih oblika bez ili sa lakim uvećanjem tiroidne žlezde, do uvećanja koje uzrokuje estetske probleme i kompresivne smetnje, sa mogućim blagim do težim formama tireotoksikoze usled

oštećenja tireocita, do iscrpljivanja istih uz prezentaciju subkliničke do manifestne hipotireoze i moguće atrofije žlezde (atrofijski tiroiditis), kada se žlezda zamenjuje fibroznim tkivom, a tiroidni folikuli skoro potpuno nestaju. Godišnja incidence progresije subkliničkog u manifestni hipotiroidizam iznosi oko 5 % (40).

#### **1.2.1.4. Hashimoto tiroiditis-dijagnoza**

Vodič Japanskog Tiroidnog Udruženja za dijagnozu HT predlaže sledeće dijagnostičke kriterijume (40,43).

Pacijent ima HT ako zadovoljava kliničke ili bilo koji laboratorijski kriterijum.

1. Klinički nalaz difuznog uvećanja tiroidne žlezde bez drugog razloga (kao i Graves-ove bolesti)
2. Laboratorijski nalazi: 1. pozitivna anti tiroid mikrozomalna antitela ili anti TPO At, 2. pozitivna anti Tg At, 3. limfocitna infiltracija u tiroidnoj žlezdi potvrđena citološkim ispitivanjem.

Dakle,

1. Pacijent je suspektan da ima HT ako ima primarni hipotiroidizam bez drugog mogućeg razloga koji može biti urok hipotiroidizma.

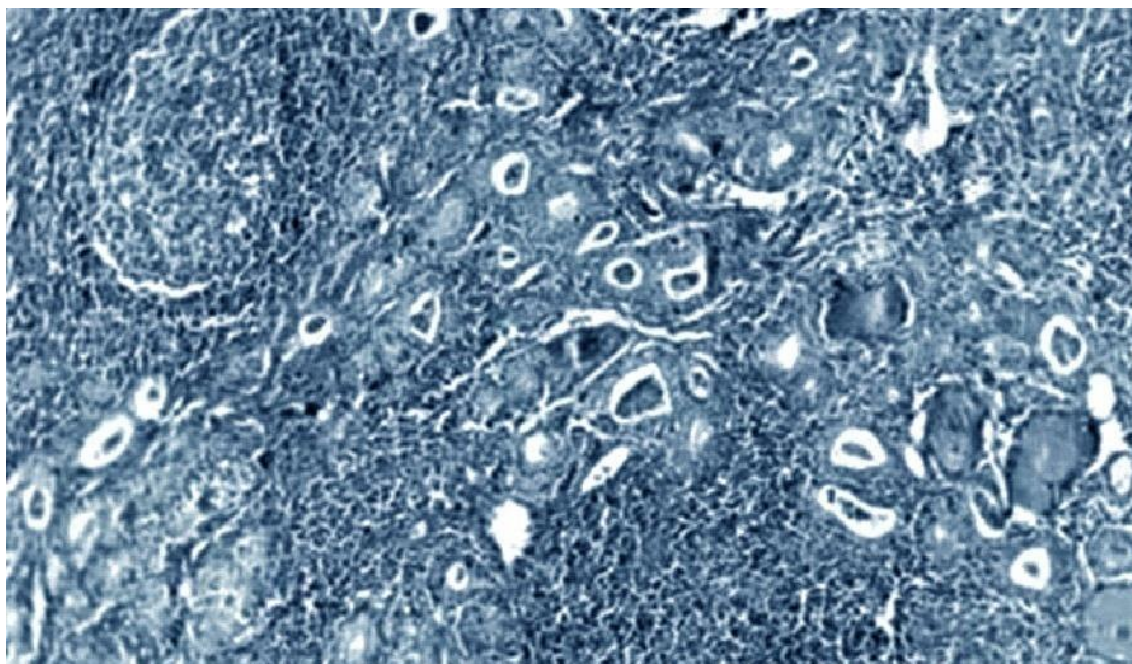
2. Pacijent je suspektan da ima HT ako ima anti TPO i/ili anti Tg At bez tiroidne disfunkcije ili strume.

3. Može se razmotriti postojanje HT ako pacijent ima tiroidnu neoplazmu i antitiroidna antitela.

4. Ukoliko tiroidna ultrasonografija pokazuje hipoehogenu ili inhomogenu strukturu tiroidnog parenhima moguće je da pacijent ima HT.

Osnovni laboratorijski testovi za postavljanje dijagnoze su određivanje anti TPO At i anti Tg At u serumu, a za procenu funkcije tiroidne žlezde određivanje TSH, fT<sub>4</sub>, fT<sub>3</sub> u serumu. Pored navedenih, u malom broju pacijenata sa HT u serumu mogu biti

prisutna i TSHR blokirajuća At. Od vizuelizacionih metoda koristi se Doppler sonografija tiroidne žlezde sa procenom vaskularizacije. Test fiksacije radioaktivnog joda i aspiraciona biopsija tankom iglom su testovi bez većeg značaja za dijagnozu HT, ali od velikog značaja za diferencijalnu dijagnozu. Ipak, HT je histološka dijagnoza. Patološki prikaz tiroidne žlezde zahvaćene HT je difuzna limfocitna i plazma ćelijska infiltracija sa formiranjem limfoidnih folikula sa hiperplazijom i oštećenjem folikula do oštećenja folikularne bazalne membrane uz evidentnu atrofiju tiroidnog folikula (Slika 4.).



*Slika 4. Patološki prikaz tiroidne žlezde u Hashimoto tiroiditisu.*

Tiroidni folikuli su mali i redukovano broja i eozinofilni su pri hemotoksilin eozin bojenju. Vidljiva je fibroza, a dominantan nalaz je profuzna mononuklearna limfocitna infiltracija i formiranje limfoidnog germinalnog centra. Prema Akamizu, Amino, DeGroot, ref (40).

#### **1.2.1.5. Hashimoto tiroiditis-diferencijalna dijagnoza**

U dijagnostičkom smislu treba uvek voditi računa da je moguća udruženost HT sa drugim autoimunim fenomenima ili njihova udruženost u poliglandularnom sindromu

tip 1 i tip 2. Potrebno je diferencijalno dijagnostički razdvojiti HT od netoksične strume, toksične nodozne strume, Graves-ove bolesti, sindroma eutiroidne bolesti, hipopituitarizma, litijumom indukovane strume, tiroidnog limfoma.

#### **1.2.1.6. Hashimoto tiroiditis-terapija**

Mnogi pacijenti ne zahtevaju tretman, jer su eutiroidni, bez simptoma i sa malom strumom, ali je potrebno praćenje hormonskog statusa na 6-12 meseci. U slučaju razvoja hipotiroidizma potrebna je supstitucija levotiroksinom (L-tiroksinom), sa praćenjem na svakih 6-8 nedelja do prilagođavanja doze, mada postoje dileme na temu primene kombinacije levotiroksina i liotironina (44). Povećanje doze levotiroksina za 25-50% je potrebno u trudnoći. U poslednje vreme publikacije govore o značaju primene selena u cilju smanjenja antioksidativnog stresa i redukcije nivoa antitiroidnih antitela (45). Pored estetskih razloga, prisustvo kompresivnih smetnji, citološki suspektan ili dokazan malignitet tiroidne žlezde ili neki drugi malignitet mogu biti indikacije za hirurški tretman.

### **1.3. Infertilitet**

#### **1.3.1. Infertilitet-definicija i incidenca**

Klinički, infertilitet se definiše kao nemogućnost koncepcije nakon godine dana redovnih seksualnih odnosa bez korišćenja kontracepcije (46). To je ozbiljan problem današnjice, ne samo zdravstveni, zbog činjenice da u oko polovine slučajeva postoje teška, često i nelečiva oboljenja reproduktivnih organa, već i psihosocijalni problem. U opštoj populaciji preko 80% parova će ostvariti trudnoću, ako je žena mlađa od 40 godina i ne koristi kontracepciju, uz uslov redovnih seksualnih odnosa, a 50% onih koji ne ostvare trudnoću u prvoj, ostvariće u drugoj godini, sa kumulativnom stopom

trudnoće preko 90% (47). Sveukupna prevalenca infertiliteta se kreće od 10 do 15% (48). Faktori koji utiču na fertilitet su brojni: godine života, alkohol, pušenje, neadekvatna supstitucija folnom kiselinom, pothranjenost i gojaznost, zanimanje, životne navike, prethodni seksualni odnosi, međutim lista se ne završava prethodno pobrojanim faktorima.

### **1.3.2. Infertilitet-podela i uzroci**

Infertilitet se može definisati kao primarni, kada žena nije stanju da iznese trudnoću, bilo u smislu da postoji nemogućnost da ostane u drugom stanju ili da ostvari rođenje živog deteta i kao sekundarni koji podrazumeva iste karakteristike kao primarni, s tim da je žena prethodno bila u drugom stanju ili ima živorođeno dete (49). Uzroke nastanka infertiliteta prema standardnim protokolima za evaluaciju delimo na: muški infertilitet 30%, ženski 35%, zajednički uzrok u 20% i infertilitet nepoznatog uzroka (idiopatski) u oko 15% slučajeva (46). Uzroci muškog infertiliteta ugrubo se mogu podeliti na pretestikularne, testikularne i posttestikularne, a podrazumevaju poremećaje u produkciji, funkciji i dopremanju spermatozoida, problem anejakulacije ili retrogradne ejakulacije, defekte u urogenitalnom sistemu nastale tokom intrauterusnog razvoja, varikocelu, hormonske poremećaje, imunološke probleme, oštećenje testisa uzrokovano hromozomskim aberacijama, kriptorhizmom, torzijom, traumom, orihitisom, sistemskim bolestima, radio ili hemoterapijom, loše životne navike, hronične bolesti, neurološki problemi i drugo. Uzroci ženskog infertiliteta ugrubo se mogu podeliti na ekstragenitalne i genitalne. Ovulatorni problem je uzrok oko 25% bračnog infertiliteta (47). Tu spadaju prema podeli SZO tri grupe (47): grupa I-disfunkcija hipotalamo-hipofizne osovine- u koju spada hipotalamusna amenoreja i hipogonadotropni hipogonadizam, prezentuje se primarnom ili sekundarnom amenorejom sa niskim vrednostima gonadotropina i estradiola; grupa II-disfunkcija hipotalamo-hipofizo-ovarijalne osovine čiji je prototip sindrom policističnih jajnika (PCOS), a u istoj grupi se ubraja i amenoreja izazvana hiperprolaktinemijom; grupa III-ovarijalna insuficijencija. Loša funkcija Falopijevih tuba u oko 14% ženskog

fertiliteta, čest je, ali i prekomerno dijagnostikovani uzrok infertiliteta (47), a razlozi mogu biti prethodne infekcije, abdominalna oboljenja, prethodne hirurgije male karlice ili abdomena sa posledičnim adhezijama i blagim do potpunim obliteracijama tuba, ektopična trudnoća, kongenitalne abnormalnosti. Endometrioza, koja se nalazi kod 25-40% žena sa infertilitetom (47), je prisustvo endometrijalne mukoze, abnormalno implantirane na mestima van uterusa kao što su peritoneum male karlice, jajnici, jajovodi. U preostale uzroke ženskog infertiliteta ubrajaju se: "sindrom nerupturiranog folikula", kongenitalne abnormalnosti, fibroidi, polipi, adenomioza uterusa, gustina cervikalnog mukusa, imunološki problemi, hromozomske aberacije. Jednako važni uzroci bračnog infertiliteta su i loša tehnika koitusa, bihevijoralni i socio-ekonomski faktori.

### **1.3.3. Infertilitet-evaluacija infertiliteta i lečenje**

Ispitivanje bračnog infertiliteta podrazumeva detaljnu evaluaciju medicinske istorije, fizikalni pregled, dijagnostičke testove počev od laboratorijskih, hormonskih, virusoloških, imunoloških i drugih analiza, kod oba partnera, ispitivanje kariotipa, kod muškog partnera ispitivanje produkcije i funkcije spermatozoida, transrektalna i skrotalna ultrasonografija i vazografija, kod ženskog partnera skrining na cervikalni karcinom, vizualizacione i invazivne metode kao što su histerosalpingografija, histerosonografija, histerosalpingo-kontrastna-ultrasonografija, pelvična ultrasonografija, pregled putem magnetne rezonance, biopsija endometrijuma, operative procedure kao što je laparoskopija i histeroskopija, procedure novijeg datuma kao fertiloskopija, faloskopija.

Lečenje može biti konzervativno, hirurško i kombinovano. Ako su druge metode bez uspeha, primenjuju se metode asistirane reproduktivne tehnologije (ART), a nekada je to i prva metoda lečenja ukoliko se radi o muškom sterilitetu koji zahteva navedenu proceduru. Metoda podrazumeva *in vitro* rukovanje sa humanim jajnim ćelijama i spermatozoidima ili embrionima u cilju ostvarivanja trudnoće. VTO (sinonim IVF) je ART procedura koja uključuje ekstrakorporalnu fertilizaciju, a obuhvata klasičan metod VTO (IVF) i mikrofertilizaciju (intracitoplazmatska injekcija spermatozoida, ICSI).

Poslednja podrazumeva injektiranje kvalitetnog spermatozoida direktno u citoplazmu jajne ćelije i tehnika je izbora kada je reč o muškom infertilitetu. Prvi uspešan pokušaj VTO 1978.godine označio je početak nove ere u terapiji infertiliteta (50). Postupak VTO podrazumeva preuzimanje jajne ćelije iz ovarijuma i njenu fertilizaciju spermatozoidom u *in vitro* uslovima, a potom transfer dobijenog embriona u intrauterusnu šupljinu. Tokom VTO ciklusa sprovode se ovarijalna stimulacija, aspiracija folikula, izdvajanje jajne ćelije, priprema sperme, fertilizacija jajne ćelije, kultura embriona i embriotransfer. Kontrolisana ovarijalna stimulacija se primenjuje u cilju produkcije većeg broja folikula i indukcije ovulacije. U tu svrhu koriste se različiti protokoli sa GnRH antagonistima (GnRH-ant) i agonistima (GnRH-a) i gonadotropini, a njihov odabir zavisi od prediktivnih faktora za uspeh VTO kakvi su godine života, indeks telesne mase (*Body Mass Index*, BMI), prisustvo policističnih jajnika i ovarijalna rezerva. U cilju procene ovarijalne rezerve određuje se broj antralnih folikula, serumska koncentracija *anti-Müllerian* hormona (AMH) i FSH. Željeni ishod i cilj VTO je normalna trudnoća u terminu, ali efikasnost i uspeh metode se mogu posmatrati i kroz odgovor jajnika na stimulaciju, broj i kvalitet jajnih ćelija, stopu fertilizacije, broj *top quality* i transferisanih embriona, ali i kroz pojavu hromozomskih aberacija, kongenitalnih malformacija, broj spontanih pobačaja, mrtvorodenosti i drugih mogućih neželjenih ishoda.

Postoji tendencija povećavanja broja parova koji radi postizanja fertiliteta ulaze u program VTO. U Ginekološko-akušerskoj klinici (GAK) "Narodni front" od početka 2007. do kraja 2016. godine sprovedeno je 2799 ciklusa VTO i ostvareno 47.4% biohemijskih i 43% kliničkih trudnoća, *baby take home* stopa je iznosila 29.9% i u tom periodu je rođeno 1042 dece. Stopa živorodenosti nakon jednog VTO ciklusa je oko 25 %, što je komparabilno sa *in vivo* fertilizacijom (51).

#### **1.4. Tiroidna autoimunost u reproduktivnom periodu-udruženost sa infertilitetom i neželjenim ishodima trudnoće**

TAI sa učestalošću od 5 do 20% je najčešće oboljenje tiroidne žlezde u reproduktivnom periodu (52), a ujedno i najzastupljenija autoimuna bolest u ovom



dobu. Poznato je da TAI sama ili udružena sa tiroidnom disfunkcijom uzrokuje brojne poremećaje kako po pitanju infertiliteta i neželjenih ishoda trudnoće, tako i u razvoju fetusa pa i kasnijem psihomotornom razvoju dece, ali dostupni podaci u literaturi nisu dovoljni za razumevanje molekularnih i patofizioloških mehanizama putem kojih tiroidna autoantitela ostvaruju ovaj efekat.

Autoimuna tiroidna bolest u trudnoći i postpartalnom periodu obuhvata: asimptomatsku autoimunu bolest sa pozitivnim tiroidnim autoantitelima u eutiroidizmu ili udruženu sa subkliničkom hipotiroidizmom (SCH); primarni hipotiroidizam na bazi HT ili u prisustvu TSHR blokirajućih antitela; Gravesovu bolest u eutiroidizmu ili hipertiroidizmu; postpartalnu tiroidnu bolest (16).

Pojam TAI, odnosi se uglavnom na prisustvo anti TPO At i/ili anti Tg At (52).

Autoimunost i trudnoća ostvaruju bidirekcionu efekat-autoimune bolesti mogu selektivno da utiču na žene u reproduktivnom periodu, ali i trudnoća ima uticaj na manifestaciju autoimunih bolesti (53) i imuni sistem uopšte. Kod većine autoimunih bolesti klinički tok tokom trudnoće se poboljšava. Trudnoća uzrokuje brojne imunološke izmene. Trofoblasti, ćelije spoljašnjeg sloja ovuluma, ne ekspimiraju klasične HLA Ia i II, koji su potrebni za prezentaciju antigena citotoksičnim i Th ćelijama, već pokazuju pojačanu ekspresiju neklasičnog HLA Ib, HLA-G koji štiti fetus od NK ćelija, a aktivnije i supresorske T ćelije. Veća je zastupljenost Th2 u odnosu na Th1 koje štetno deluju na fetus. Hormonske izmene utiču na imuni sistem-porast progesterona dovodi do redukcije B ćelijske aktivnosti, a estrogen smanjuje produkciju antitela. Smatra se da trudnoća može biti trigger za TAI usled pokretanja imunoloških adaptacionih mehanizama. Nemogućnost koncepcije kod žena sa TAI, povezana je sa oštećenim humoralnim i celularnim imunim odgovorom (54,55). Povezanost TAI, kao Th1-ćelijski posredovane autoimunosti ka tirocitima sa povišenom ekspresijom *tumor necrosis* faktorom (TNF)- $\alpha$ /IL-10, povišenim CD3(+)/CD4(+) odnosom ćelija, titrom CD56(+) NK ćelija, prevalencom antikardiolipinskih antitela i drugih organ nespecifičnih antitela i dva do tri puta učestalija aktivnost poliklonalnih B ćelija, pokazana je u publikacijama, ali uz evidentan porast nivoa TSH u istoj grupi TAI pozitivnih žena (54,56). Da bi se trudnoća održala, suprimira se i maternalni i placentalni imuni odgovor. Glavnu ulogu imaju CD4+CD25+ T ćelije, regulatorne T ćelije (Treg) koje su od značaja ne samo u toleranciji protiv sopstvenih i stranih

antigena, nego i u fetalnoj toleranciji, a čija proliferacija je pod dejstvom estrogena (57). Međutim, pokazano je da su navedene ćelije disfunkcionalne u TAI (58). Naime, decidua je mesto najznačajnije interakcije endokrinog i imunog sistema, gde još u ranim fazama gestacije dolazi do značajnog povećanja uterinih (u)NK ćelija, uzrokovano preraspodelom istih iz periferne krvi pod uticajem seksualnih steroida. Iako postoje dokazi o ulozi uNK ćelija u razvoju placentalne vaskulature, uloga u humanoj gestaciji nema konačne dokaze, mada postoje pretpostavke o njihovom uticaju na razvoj placente i trofoblasta, kao i u imunomodulaciji u kontaktu majke i fetusa (59). S tim u vezi, nije iznenađujući podatak o promeni njihovog broja i funkcije u neuspehoj koncepciji, ali i rekurentnim spontanim pobačajima (60). Međutim, u pojedinim publikacijama korelacija između anti TPO At i povišenog broja uNK ćelija u endometriju u periodu implantacije, se ne nalazi (61). Hiperaktivnost i povišena migracija citotoksičnih NK ćelija, koja menja imunski i hormonski odgovor uterusa je do 40% češća u žena sa TAI (56). Grubo posmatrano u odnosu na nivo TSH, patogenetski mehanizam neuspeha u ostvarivanju fertiliteta, može biti TSH zavistan i TSH nezavistan. Poslednji se ogleda u izmeni profila endometrijalnih T-ćelija u smislu redukovane sekrecije IL-4 i IL-10, uz pojačanu sekreciju IFN- $\gamma$ , što vodi porast aktivnosti Th1 ćelija i B ćelija.

Iako je pad titra antitela tokom gestacije očekivan čak do 60%, zapaža se kod asimptomatskih žena sa pozitivnim anti TPO At i/ili anti Tg At, koje se eutiroidne u ranoj trudnoći, mogućnost progresije ka hipotiroidizmu tokom trudnoće i porasta TSH preko 4 mIU/L kod čak 60% žena, a 33-50% žena koje imaju pozitivna tiroidna autoantitela u prvom trimestru će razviti postpartalno tiroiditis (22,62). Ovakva deterioracija funkcije tiroidne žlezde vodi daljoj nemogućnosti da se ista adaptira na povećane zahteve, što uzrokuje *circulus vitiosus*. Naime, pokazano je da kod TAI pozitivnih eutiroidnih žena TSH raste progresivno tokom gestacije od srednje vrednosti 1,7 mIU/L (u 12.nedelji) do 3,5 mIU/L (do termina), a čak 19% žena ima supranormalne vrednosti TSH u momentu porođaja (63). Veruje se da u prvih 2 do 6 meseci nakon porođaja titar tiroidnih autoantitela, koji se snizio tokom trudnoće, opet raste i može dovesti do hipotiroidizma. Veliki broj studija je objavljen na temu uticaja TAI, posebno anti TPO At, na infertilitet žena i neželjene ishode trudnoće (64–74). Čak 31% trudnoća se završi spontanim pobačajem, dok je incidenca dva konsektivna spontana pobačaja 2-4%, a tri manja od 1% (75). Da je kod žena sa TAI prisustvo

drugih doprinosećih faktora od velikog značaja u proceni fertiliteta, govori podatak da je ova populacija nešto starije životne dobi (74), a ako se uzme u obzir uticaj TSH na oslobađanje leptina iz masnog tkiva i činjenica da je TSH u pozitivnoj korelaciji sa telesnom masom, moglo bi se očekivati da je i telesna masa TAI pozitivnih žena veća nego kod TAI negativnih (76).

Primena levotiroksina u terapiji kod TAI pozitivnih eutiroidnih žena pokazala je dobar efekat u smislu smanjenja stope prevremenih porođaja, spontanih pobačaja, povećanja stope kliničke trudnoće (63,75,77–81), posebno pri serumskim koncentracija TSH > 2,5mIU/L (82).

Fetalni mikrohimerizam je dodatni faktor koji bi mogao biti uzročnik pobačaja (83). Fetalni mikrohimerizam je prisustvo fetalnih ćelija u majčinom tkivu, tokom gestacije, što znači da bi prisustvo fetalnih ćelija u majčinom tkivu moglo da provocira autoimuni odgovor majke na fetoplacentalnu jedinicu.

Kao što je prethodno navedeno, PCOS i endometrioza su među glavnim uzrocima ženskog infertiliteta. Najčešći razlog hipotiroidizma, u jod-suficijentnim mestima, je TAI, a hipotiroidizam uzrokuje policističnu izmenu ovarijuma. Hipotiroidizam vodi porastu prolaktina i TSH, prolaktin porastu odnosa FSH/LH sa izostankom ruptur folikula, porastu adrenalnog dehidroepiandrostediona (DHEAS) koji obustavlja folikularnu maturaciju, dok porast TSH uzrokuje efekat preliivanja na FSH receptorima, uz moguću depoziciju kolagena u ovarijumu (84). Pokazano je da anti TPO At pozitivno koreliraju sa estradiolom, estradiol/progesteron odnosom i TSH (85). Gojaznost, insulinska rezistencija, izmenjen lipidni status mogu doprineti rasvetljavanju, ali konačni patogenetski mehanizam povezanosti TAI i PCOS, ipak ostaje nerazjašnjen. Dijagnoza PCOS postavlja se dokazivanjem prisustva dva od tri kriterijuma: poremećaj menstrualnog ciklusa od oligomenoreje do amenoreje sa anovulacijom, laboratorijskim ili kliničkim znacima hiperandrogenizma i prisustvom policistično izmenjenih jajnika (86).

Prevalenca TAI, prvenstveno anti TPO At, u endometriozi i infertilitetu se kreće do 29% (68). Endometrioza uzrokuje izmenjen autoimuni odgovor. TRH je redukovan u endometriju, a dešava se niz biohemijskih izmena na putu aktivacije TH (2).

### 1.4.1. Tiroidna autoimunost i hipotiroidizam u trudnoći

Prevalenca SCH (povišen serumski TSH iznad gornje granice trimestar specifičnih referentnih vrednosti uz  $fT_4$  u referentnim granicama, SAD) se kreće od 2 do 3%, a manifestnog hipotiroidizma (povišen serumski TSH iznad određene granice za trimestar uz snižen serumski  $fT_4$  ili  $TSH > 10$  mIU/L nezavisno od vrednosti  $fT_4$ ) 0,3 do 0,5% kod žena u trudnoći (22,78). Najčešći uzrok hipotiroidizma u svetu i dalje ostaje deficijencija joda. Ipak, u jod suficijentnim regijama, hronični autoimuni tiroiditis je osnovni uzrok maternalog hipotiroidizma (71). I dok neki autori, predlažu kao definiciju SCH u trudnoći TSH između 2,5 i 10 mIU/L uz normalan  $fT_4$  (22), za druge ostaje otvoreno pitanje da li za postavljanje dijagnoze SCH u trudnoći definisati gornju granicu  $TSH > 2,5$  mIU/L, koja je referentna za prvi trimester, a ne onu koja je gornja referentna granica za pregestacijski period od 4 mIU/L. Ipak, još uvek je nedovoljno dokaza da pri vrednostima  $TSH > 2,5$  mIU/L uz normalan  $fT_4$  postoji veći rizik od infertiliteta, dok je rizik od infertiliteta pri serumskim koncentracijama  $TSH > 4$  mIU/L pokazan u brojnim studijama (82). Merenje ukupnog  $T_4$  (sa vrednostima prilagođenim trudnoći) i  $fT_4$  indeksa je pouzdanije od merenja  $fT_4$  (23).

Hipotiroidne žene mogu imati poremećaj menstracionog ciklusa do tri puta češće nego u eutiroidnoj populaciji (oligomenoreja, amenoreja, polimenoreja, menoragija), a njima mogu doprineti i poremećaji hemostaze (sniženje nivoa faktora koagulacije VII, VIII, IX i XI) (71). Globulin koji vezuje polne hormone (*sex hormone binding globulin*, SHBG) je snižen, što rezultuje u sniženju ukupnog testosterona i estradiola, ali su njihove slobodne frakcije povišene, dok je nivo gonadotropina najčešće normalan uz odložen LH odgovor na GnRH, što može dovesti do skoka prolaktina i galaktoreje, koja se reguliše po uvođenju supstitucije. Smanjen je metabolički klirens androstenediona i estrona, a povećana periferna aromatizacija. Odložena pulsativna aktivnost LH uzrokuje neadekvatnu sekreciju progesterona iz žutog tela. Takođe, veruje se da promene koje se dešavaju na grliću materice, kao što je molekularna atipija endocervikalnih ćelija, su posledica smanjene senzitivnosti na delovanje estrogena zbog niskih vrednosti slobodnih frakcija TH u plazmi (87). Sve prethodno navedeno, znatno utiče na razvoj blastociste, kao i postizanja adekvatne stope fertilizacije.

SCH i klinički hipotiroidizam uzrokuje brojne maternalne i fetalne komplikacije- subfertilnost, spontani pobačaj, rekurentne spontane pobačaje, anemiju, gestacioni dijabetes, gestacionu hipertenziju, preeklampsiju, eklampsiju, prevremeni porođaj, placentalnu abrupciju, postpartalnu hemoragiju, carski rez, malu telesnu masu novorođenčeta (<2,5 kg na rođenju) ili povišenu telesnu masu na rođenju (> 4 kg), respiratorni distres sindrom i smrt novorođenčeta, neurološke deficite u razvoju fetusa i kasnije poremećaje u psihomotornom rastu (63,74,88–96). Pokazano je da za svako udvostručavanje serumske koncentracije TSH, gubitak ploda raste do 60% (90). TAI je povezana sa smanjenom ovarijalnom rezervom i sniženim vrednostima AMH, ali i povišene vrednosti TSH su u vezi sa niskim AMH kod žena sa infertilitetom (97,98).

Žene koje imaju pre trudnoće  $TSH \geq 2,5$  mIU/l imaju nižu stopu ostvarivanja trudnoće, a one sa hipotiroidizmom imaju lošiji kvalitet oocita, nižu stopu začeca ne samo spontano, nego i putem VTO. Zato je granica serumske vrednosti TSH 2,5 mIU/l preporučena kao maksimalna prekonceptijska kod hipotiroidnih žena tretiranih levotiroksinom. Kod maternalnog hipotiroidizma preporučuje se isključivo terapija levotiroksinom, uz striktno preporuke da se ne upotrebljavaju drugi tiroidni preparati (22,78). Povećanje doze levotiroksina u odnosu na pregestacijski period, iznosi oko 30 do 50%, odnosno od 1,6-2,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 2,0-2,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (71). Po izmeni doze leka, dalja kontrola tiroidne funkcije je na 4 nedelje do postizanja željenih terapijskih vrednosti TSH tokom prve polovine trudnoće i makar jednom između 26. i 32. nedelje gestacije (22). Terapija se modulira do postizanja željenih vrednosti koje odgovaraju nižoj polovini referentne vrednosti specifičnoj za trimester ili  $TSH < 2,5$  mU/L (23). Potrebe za povećanjem doze nastupaju vrlo rano, već oko 4.-6. nedelje gestacije, a nastavljaju da rastu do između 16. i 20. nedelje. Pokušaji da se kao preporuka uvede, povećanje doze levotiroksina pre trudnoće u cilju sprečavanja očekivanog skoka TSH, nisu dale neke značajnije rezultate, ali bi smanjile broj žena koje hipotiroidne ulaze u gestaciju (99). Međutim, ako se kod žena TSH pre trudnoće kreće između 2,5 i 4 mIU/L, preporučuje se ili kontrola vrednosti TSH na svake 4 nedelje i terapiju kada vrednost TSH pređe granicu od 4 mIU/L, ili se može razmotriti primena supstitucione terapije do postizanja ciljane vrednosti od 2,5 mIU/L (82). Jedna grupa autora smatra da ukoliko je kod trudnica TSH preko 2,5 mIU/L terapija se preporučuje ukoliko su prisutna anti TPO At (21). Ipak, postoje autori koji preporučuju terapiju SCH u trudnica čak i ukoliko antitela

nisu prisutna (78). Ukoliko se nastavlja kontrola kod netretirane SCH onda se ista sprovodi na svake 4 nedelje do između 16. i 20. nedelje gestacije i najmanje jednom između 26. i 32. nedelje gestacije (22). Ako je hipotiroidizam dijagnostikovao u trudnoći, neophodna je što ranija supstitucija hormona do željenih trimestar referentnih vrednosti, uz preporučeno retestiranje (78). Ako je dijagnostikovao ozbiljan deficit TH u trudnoći, startno se može dati dva do tri puta veća doza od očekivane dnevne prvih par dana. Kod eutiroidnih žena sa TAI provera tiroidne funkcije bi trebalo da se sprovodi svake 4 nedelje u prvoj polovini trudnoće i najmanje još jednom između 26. i 32. nedelje (22).

Potreba za smanjenjem doze povećane tokom gestacije, obično se javlja već do 6. nedelje postpartalno (71).

Primena levotiroksina značajno je smanjila mogućnost pojave neželjenih ishoda trudnoće i fetalnog razvoja (93,100–103). Ipak, na osnovu dosadašnjih studija, značaj primene supstitucione terapije u SCH u smislu poboljšanja maternalnih i fetalnih ishoda ostaje neubedljiv (95).

#### **1.4.2. Značaj folikularne tečnosti za kvalitet jajne ćelije**

Folikularna tečnost ispunjava folikularni antrum i okružuje ovum u ovarijalnom folikulu, a produkt je sastojaka krvi koji dospevaju preko krvno-folikularne barijere i sekretorne aktivnosti granulosa i tekalnih ćelija (104). Sastav folikularne tečnosti se sve više ispituje u smislu značaja komponenata folikularne tečnosti kao prediktora kvaliteta oocita (105). Kao većina biofluida, folikularna tečnost sadrži visoku koncentraciju vode, lipida, ugljenih hidrata, proteina i enzima, neorganskih soli, mukopolisaharida, peptidnih hormona, antikoagulanasa i neuobičajeno visoke koncentracije steroida (106). Bidirekionalna veza somatska ćelija-jajna ćelija je esencijalna za intrafolikularnu mikrosredinu koja kontroliše rast primordijalnog u kohortu rastućih folikula do antralnog folikula tokom procesa folikulogeneze (107). Poređenje sastava folikularne tečnosti i seruma bi moglo biti od značaja u cilju ispitivanja mikrosredine jajne ćelije. Međutim, na sastav folikularne tečnosti može da utiče i kvalitet folikula u kome se nalazi jajna ćelija, ali i brojni faktori kao što su starost majke, njene životne navike, ali i

tip ovarijalne stimulacije (105). Dosadašnje studije, ipak nisu uspele da identifikuju molekularni marker folikularne tečnosti koji bi bio dovoljno pouzdan da proceni kvalitet jajne ćelije koji će biti upotrebljen za proces fertilizacije u metodi VTO. Nepovoljni uslovi folikularne sredine vode razvoju nekvalitetne jajne ćelije, a samim tim i smanjenju kvaliteta embriona koja se koristi u VTO. Takav sled događaja vodi smanjenju stope uspešnosti VTO procedure. U tom smislu, metabolički i transkripcioni parametri jajne ćelije bi mogli poslužiti kao prediktivni marker za procenu stope uspešnosti reprodukcije (108). Poseban značaj daje se prisustvu vaskularnog endotelnog faktora rasta (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), hormona rasta (HR), insulin sličnom faktoru rasta (*insulin-like growth factor*, IGF) 1 i 2 i njihovim vezujućim proteinima (*insulin-like growth factor binding protein*, IGFBP) 3 i 4, leptinu, AMH, EGF, ali i drugim metabolitima u folikularnoj tečnosti, u cilju procene njihovog uticaja na razvoj i kvalitet jajne ćelije (109–111). Acelularna zona pelucida, koja okružuje jajnu ćeliju tokom ovulacije, sadrži receptore za spermatozoide. Antitela na zonu pelucidu (AZP), koja se nalaze u folikularnoj tečnosti, izgleda da imaju ulogu u etiologiji infertiliteta, posebno neobjašnjelog, ali pretpostavlja se da mogu biti i razlog dugogodišnje rezistencije na terapiju, verovatno ometajući interakciju jajne ćelije i spermatozoida (112–114). Time bi se mogao objasniti značaj ICSI-a u postizanju fertiliteta, imajući u vidu da se kontakt spermatozoida sa zonom pelucidom ovom metodom zaobilazi. Veruje se čak, da bi ova antitela mogla biti rezultat ponavljanih mikrotrauma usled repunkcija folikula u VTO procedurama (115). Po prvi put, dokazano je prisustvo anti-laminin-1 antitela u serumu i folikularnoj tečnosti žena sa infertilitetom i HT u program VTO i uticaj istih na sazrevanje jajne ćelije i ishod IVF-a, pokazujući znatno nižu koncentraciju zrelih MII jajnih ćelija, nižu stopu implantacije i trudnoće u ovih žena, koja je bila u obrnutoj korelaciji sa koncentracijom antitela (116). Naime, laminin je glavni glikoprotein bazalne membrane i ima ulogu u ćelijskoj adheziji, migraciji, proliferaciji i diferencijaciji, a laminin-1 u embrionu se nalazi u sastavu horionske bazalne membrane, utiče na povećanu ekspresiju kolagenaze tip 4 i poboljšava trofoblastnu adheziju za maternalni matriks.

Estradiol, testosteron i progesteron su tri ključna hormona tokom folikularne i lutealne faze menstrualnog ciklusa. Progesteron, ‘hormon trudnoće’ je od esencijalnog

značaja za uspešnu implantaciju embriona i prevenciju pobačaja (117). Primarno se sekretuje iz žutog tela jajnika tokom druge polovine menstrualnog ciklusa, povećava telesnu temperature i indukuje transformaciju proliferativnog u sekretorni endometrijum radi pripreme za implantaciju. Nakon ostvarene trudnoće se sekretuje iz placente. Ima važnu ulogu u prevenciji pobačaja, smanjujući sintezu prostaglandina, smanjuje degradaciju stromalnih ćelija cerviksa smanjujući mogućnost infekcije, smanjuje broj oksitocinskih receptora, kao i sponatnu miometrijalnu kontraktilnost (117). Povišene koncentracije progesterona na dan završne injekcije hCG-a u VTO proceduri pozitivno koreliraju sa neuspehom metoda VTO (118).

### **1.4.3. Tiroidna autoimunost i ishodi vantelesne oplodnje**

Shodno brojnim publikacijama, veruje se da bi tiroidna autoantitela mogla biti nezavisni marker neuspešnih ishoda VTO (119), delujući na proces folikulogeneze, fertilizacije i embriogeneze (120). Kod TAI pozitivnih žena, s posebnim osvrtom na anti TPO At, koja su u programu VTO niža je stopa fertilizacije i implantacije (121), ali i veća učestalost spontanih pobačaja, uz nešto više godine starosti i vrednost TSH (77,122–126).

Ovarijalna stimulacija, kao deo procedure VTO, ima uticaja na tiroidnu funkciju, posebno kod žena sa prisutnim tiroidnim autoantitelima i/ili hipotiroidizmom, prvenstveno u smislu porasta serumske koncentracije TSH (127,128). Eutiroidne žene ili one sa SCH i TAI mogu postati hipotiroidne tokom stimulacije gonadotropinima, uz pad fT<sub>4</sub> i porast TSH i ponegde, zapažen pad titra TPO At (129,130). Pacijentkinje koje su hipotiroidne pre započinjanja stimulacije zahtevaju što ranije prilagođavanje doze levotiroksina (131). Međutim, o promeni fT<sub>4</sub> tokom ovarijalne stimulacije ne postoji jedinstven stav, već se negde beleži i istovremeni porast serumskih koncentracija TSH i fT<sub>4</sub> tokom navedene procedure (132). Naime, primena gonadotropina tokom procesa stimulacije, uzrokuje porast estradiola čak do vrednosti onih u drugom trimestru spontano začete trudnoće, uzrokujući promene hipotalamo-hipofizo-tiroidne osovine. Nakon završne hCG injekcije u cilju izazivanja ovulacije, postoji pik u serumskoj vrednosti estradiola, a TSH raste dosežući pik nakon nedelju dana, da bi se potom snizio



na bazne vrednosti (133). Što su niže vrednosti serumskog TSH pre započinjanja procedure, više su serumske vrednosti estradiola na dan aspiracije oocita i veća je šansa dobijanja zrelog oocita, sa boljom stopom fertilizacije. Veruje se da bi se negativan uticaj ovarijalne stimulacije na ishod VTO u ovoj populaciji mogao izbeći adekvatnom supstitucijom levotiroksina održavajući TSH <2.5 mIU/L (71,134).

Neke studije pak nisu našle vezu između TAI i neželjenih ishoda klasičnog VTO i/ili ICSI metoda (135–140).

Međutim, posmatrati TAI kao izolovani faktor za nemogućnost fertilizacije, u stanju subfertilnosti žena koja ulaze u program VTO, zadaje problem. Ova grupa žena je najčešće starije životne dobi (135), njihov psihosocijalni moment je neizostavan, a na komorbiditete se ne sme zaboraviti.

Na osnovu dokazane činjenice, da antikardiolipinska antitela prolaze u umbilikalnu cirkulaciju i amnionsku tečnost i reaguju sa sinciciotrofoblastom i citotrofoblastom (141,142), mogao bi se pretpostaviti sličan mehanizam delovanja i za tiroidna autoantitela.

U delu ‘Tiroidna autoimunost u reproduktivnom periodu-udruženost sa infertilitetom i neželjenim ishodima trudnoće’, naglašen je značaj tiroidnih autoantitela i njihova česta udruženost sa PCOS u žena sa infertilitetom. Visok anti TPO At kod ovih pacijentkinja povezan je sa lošim ishodom u postupku VTO (143).

U cilju moduliranja imunog dogovora, a radi poboljšanja stope implantacije i trudnoće, primenjivani su i imunoglobulini (144) i kortikosteroidi (145), pojedinačno ili u kombinaciji sa levotiroksinom (146). Pojedini pokušaji da se supstitucijom levotiroksinom poveća stopa trudnoće kod anti TPO At pozitivnih žena u odnosu na one sa istim negativnim autoantitelima, koje ulaze u program VTO, nisu dali značajnije rezultate (147). I pored nedovoljno dokaza, ipak se može uzeti u razmatranje primena levotiroksina kod eutiroidnih trudnica sa anti TPO At i istorijom prethodnih spontanih pobačaja (23). Čak i pored adekvatne supstitucije levotiroksinom žene koje imaju hipotiroidizam imaju manje šanse da ostvare trudnoću putem VTO (148), zbog čega je neophodno povećanje doze leka (149). Pokazane su i razlike u smislu lošijeg odgovora na stimulaciju, dužeg trajanja stimulacije, manjeg broja viabilnih embriona, niže stope fertilizacije, ali bez razlike u stopi implantacije, trudnoće i porođaja u grupi adekvatno

supstituisanih hipotiroidnih žena kod kojih se vrednosti TSH održavaju terapijom ispod preporučene granice od 2.5 mIU/L, u odnosu na grupu eutiroidnih žena (150).

### **1.5. Da li bi bio opravdan prekonceptijski skrining za tiroidna autoantitela?**

Imajući u vidu sve prethodno navedeno, idealno bi bilo obezbediti univerzalni skrining za tiroidnu disfunkciju i TAI kod žena koje planiraju trudnoću, posebno kod žena koje ulaze u program VTO. Ova ideja prisutna je duži period, ali bez konačnog odgovora, usled nedostatka dokaza da podrže rutinski skrining za anti TPO At u ranoj trudnoći, kao i primeni levotiroksina u terapiji kod eutiroidnih TAI pozitivnih žena (151). Ne samo TSH i tiroidna autoantitela, već i fT4 bi bio neophodan u skriningu, jer ne tako retko postoji i problem izolovane hipotiroksinemije (69). Tiroidna autoantitela se nalaze kod 50% trudnica sa SCH, odnosno 80% sa manifestnim hipotiroidizmom (152), ali ne postoji konsenzus o njihovom rutinskom određivanju prekonceptiji ili tokom trudnoće. Ipak, Američko Tiroidno Udruženje preporučuje da se svim trudnicama sa TSH > 2,5 mU/L urade anti TPO At (23). Obezbeđen i postignut konsenzus za skrining na tiroidnu disfunkciju kod visoko rizičnih grupa žena, do 9.nedelje gestacije ili na prvom pregledu pre, odnosno tokom trudnoće prema smernicama Endokrinološkog Društvo (SAD) (Tabela 3) (78). Preporučuje se da eutiroidnim trudnicama koje imaju pozitivna anti TPO At ili anti Tg At treba meriti serumsku koncentraciju TSH u trenutku potvrđivanja trudnoće i svake 4 nedelje tokom drugog trimestra (23).

Tabela 3. Kategorije žena sa visokim rizikom za tiroidnu disfunkciju. Adaptirano iz De Groot, ref.(78)

<b>Pacijentkinje u riziku za tiroidnu disfunkciju, u prekonceptijskom periodu ili trudnoći</b>
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Starost preko 30 godina</li><li>2. Familijarna istorija autoimune tiroidne bolesti i hipotiroidizam</li><li>3. Struma</li><li>4. Pozitivna tiroidna autoantitela, posebno anti TPO At</li><li>5. Klinički simptomi i znaci hipotiroidizma</li><li>6. Dijabetes tip 1 ili druge autoimune bolesti</li><li>7. Infertilitet</li><li>8. Istorija pobačaja/prevremenog porođaja</li><li>9. Istorija terapijskog zračenja glave ili vrata/ tiroidne hirurgije</li><li>10. Aktuelna terapija levotiroksinom</li><li>11. Žene koje žive u jod-deficijentnim regionima</li></ol>

Sličnu kategorizaciju žena sa visokim rizikom za tiroidnu disfunkciju predlaže i Američko Tiroidno Udruženje (22,23). Ipak, ova dva udruženja se ne slažu u svim preporukama (153). Ukratko, Američko Tiroidno Udruženje ne predlaže lečenje izolovane hipotiroksinemije u trudnoći, dok Endokrinološko Društvo ne daje preporuke na ovu temu. Primena levotiroksina kod SCH trudnica sa negativnim tiroidnim autoantitelima se preporučuje u Endokrinološkom Društvu, ali Američko Tiroidno Udruženje nema dovoljno dokaza na ovu temu, kada je reč o ženama koje nemaju TAI i ne ulaze u VTO program, a jake preporuke za terapiju postoje za žene sa anti TPO At i TSH iznad referentnog opsega specifičnog za trudnoću, kao i bez anti TPO At ukoliko je TSH > 10 mU/L. Kada je reč o trudnicama sa HT na terapiji levotiroksinom Američko Tiroidno Udruženje ne predlaže nikakve dalje procedure, sem hormonskog testiranja, dok Endokrinološko Društvo nema preporuka na ovu temu. Dostupni podaci ne govore niti u prilog ni protiv univerzalnog skininga (153). Međutim, ako se skining sprovodi samo ciljano kod žena sa visokim rizikom od razvoja tiroidne disfunkcije,

može se prevideti čak 1/3 trudnica sa tiroidnom bolešću (154), zato se i predlaže univerzalni skrining. Kakav je odnos troškovi-benefit? Mnogo godina unazad je prepoznat ovaj problem i potreba za rešavanjem istog, zasnovano na tri benefita: progresija subklinikog u manifestni hipotiroidizam, udruženost sa hiperholesterolemijom i prethodno neprepoznati simptomi usled lake deficijencije TH (155). Poseban značaj skrining ima u smislu blagovremenog započinjanja supstitucione terapije, naročito zbog pravilnog psihomotornog razvoja deteta, kao što je pokazano u ranije navedenim studijama. Ipak, u studiji *Controlled Antenatal Thyroid Screening* prenatalni tiroidni skrining i terapija maternalnog hipotiroidizma nisu poboljšali koeficijent inteligencije u potomstvu (156). U toku su velike prospektivne randomizovane kontrolisane studije koje govore u prilog univerzalnog skrininga, radi otkrivanja većeg broja žena sa hipotiroidizmom, posebno onih sa SCH i tretmana istih (157).

Ako uzmemo u obzir značaj TAI kod žena u programu VTO, posebno imajući na umu činjenicu o pogoršanju tiroidne funkcije kod ovih žena tokom procesa stimulacije jajnika, onda bi svakako kao deo redovnog skrininga trebalo predložiti određivanje TSH, fT<sub>4</sub> i tiroidna autoantitela u pripremi za VTO. S druge strane, ne bi se smela zanemariti ni folikularna tečnost, čija je uloga u razvoju kvalitetne jajne ćelije neosporna, pa bi određivanje prethodno navedenih parametara, imalo veliki značaj u smislu prediktivne vrednosti za uspeh VTO, iako su potrebna buduća istraživanja da dodatno doprinesu na značaju ovoj ideji.

## 2. CILJEVI RADA

Ciljevi istraživanja su:

1. Ispitati prisustvo tiroidnih autoantitela u folikularnoj tečnosti kod pacijentkinja sa pozitivnim tiroidnim autoantitelima u perifernoj krvi
2. Oceniti uticaj tiroidne autoimunosti na postizanje fertiliteta metodom vantelesne oplodnje
3. Da li i u kojoj meri se ishodi vantelesne oplodnje razlikuju među pacijentkinjama koje imaju i onim koje nemaju pozitivna tiroidna autoantitela u folikularnoj tečnosti.

### **3. METOD RADA**

U okviru ove prospektivne opservacione studije biće ocenjen uticaj TAI na postizanje fertiliteta VTO-om. U studiji pojam TAI, odnosi se na prisustvo anti TPO At i/ili anti Tg At, ali ne i TSHR At ili At na druge tiroidne antigene, koja ne ostvaruju citotoksičnu aktivnost (26,39,158).

#### **3.1. Vreme i mesto istraživanja**

Studija je sprovedena u GAK "Narodni front" u Beogradu, u periodu od novembra 2014. godine do jula 2016. godine. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta GAK "Narodni front" i od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu.

#### **3.2. Ispitanici – jedinice posmatranja**

Ispitanici, odnosno jedinice posmatranja predstavljaju sve konsekutivne pacijentkinje sa problemom infertiliteta, kojima je urađena VTO u okviru Nacionalnog programa VTO u GAK "Narodni front". U studiju su ušle ukupno 52 pacijentkinje, 26 pacijentkinja u ispitivanoj i 26 pacijentkinja u kontrolnoj grupi (inicijalno 27 pacijentkinja kontrolne grupe, od čega je jedna povukla saglasnost tokom daljeg toka studije).

## Kriterijumi za uključenje u studiju

Sve pacijentkinje koje ulaze u program VTO, morale su zadovoljiti sledeće kriterijume propisane od Republičke stručne komisije Ministarstva zdravlja za postupke biomedicinski potpomognutog oplodjenja (BMPO): neplodnost i pored odgovarajućeg lečenja, da nisu rađale ili nemaju žive dece sa istim partnerom, starosti do napunjenih 40 godina u momentu dobijanja odluke o ispunjenosti uslova za uključivanje u proces VTO od strane Komisije za VTO nadležne državne zdravstvene ustanove, da imaju očuvanu funkciju jajnika, BMI < 30 kg/m<sup>2</sup>, ili čiji partneri imaju neki oblik subfertilnosti, uz postojanje živih ili morfološki ispravnih spermatozoida u ejakulatu, a da one i njihovi partneri poseduju rezultate izvršenih sledećih analiza i dijagnostike, i to: kod oba partnera-mikrobiološko ispitivanje (bakterije Chlamydia, Mycoplasma), hepatitis B površinski antigen (HbsAg), hepatitis C virus (HCV), virus humane imunodeficijencije (HIV), *Venereal Disease Research Laboratory* (VDRL) test na sifilis – serologija, kod ženskog partnera hormonsko ispitivanje: od 2-4 dana od početka menstrualnog krvavljenja (jednokratno)- FSH, LH, estradiol, progesteron, testosteron, prolaktin, TSH, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, AMH; mikrobiološko ispitivanje (Toxoplasma gondii, Rubellu-serologija), skrining grlića (bris po Papanikolau, kolposkopija), ultrazvučni pregled obavljen vaginalnom sondom.

U studiju su uključene pacijentkinje sa različitim etiološkim faktorima kao što su oboljenja jajovoda, endometrioza, PCOS, infertilitet nepoznatog uzroka, parovi sa problemom mešovitog infertiliteta, pacijentkinje čiji partneri imaju problem infertiliteta.

## Kriterijumi za isključenje iz studije:

Komisija za VTO definisala je sledeće kriterijume za isključenje iz procedure VTO: parovi kod kojih nisu iscrpljene druge mogućnosti za lečenje infertiliteta, žene kod kojih nije očuvana rezerva jajnika, žene koje imaju BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>, anomalije i benigni tumori materice, jajovoda i jajnika koji onemogućavaju proces VTO, nastanak i razvoj trudnoće, postojanje malignih ili tumora sumnjivih na malignitet na materici, jajovodu i jajniku, bilo koja oboljenja (internistička, imunološka, infektološka,

neurološka, psihijatrijska) ukoliko su bez dozvole za sprovođenje procedure VTO odgovarajućeg specijaliste, oboljenja kod kojih bi anestezija ili trudnoća potencijalno ugrožavali život pacijentkinje, kao i svi oblici muške neplodnosti kod kojih nema živih ili morfološki ispravnih spermatozoida u ejakulatu.

Iz studije su isključene one pacijentkinje koje boluju od bilo koje druge endokrine bolesti za koju je potvrđeno da utiče na fertilitet.

### **3.3. Klinička metodologija**

Svaka pacijentkinja koja je ušla u program VTO na odeljenju ART, GAK "Narodni front", prošla je detaljan anamnestički i fizikalni pregled. Nakon dobijanja pismene saglasnosti, za svaku od ispitanica je popunjen dokument koji sadrži demografske i antropometrijske podatke, podatke o porodičnoj i ličnoj anamnezi, podatke o bolesti tiroidne žlezde (dijagnoza, vreme postavljanja dijagnoze u odnosu na ispitivanje, ukoliko uzima terapiju doza i dužina uzimanja iste, opis prethodno urađenog eho pregleda tiroidne žlezde, prisustvo nodusa i ukoliko je rađena, aspiraciona biopsija istih tankom iglom, ili eventualno prethodno rađena scintigrafija), a celokupna dokumentacija o VTO korišćena je iz baze podataka GAK "Narodni front" koji postoji u pisanom i elektronskom obliku *Meditex* formi.

#### **3.3.1. Serumske hormonske analize i tiroidna autoantitela**

Krv se uzorkovala, jutro na dan pre početka protokola za ovarijalnu stimulaciju, u epruveti od 5ml, potom centrifugirala 10 minuta/3000 rpm, a zatim su se u dobijenom serumu određivale koncentracije TSH, fT<sub>4</sub>, fT<sub>3</sub>, anti TPO At i anti Tg At. Hormonske i imunološke analize su određivane u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku "Konzilijum" u Beogradu, na automatskom analizatoru Cobas 6000 firme ROCHE, komercijalnim testovima iste firme baziranim na principu imuno-hemiluminiscentne metode. Referentne vrednosti su: TSH 0,40-4,00  $\mu$ IU/ml, fT<sub>4</sub> 12,00-22,00 pmol/l, fT<sub>3</sub> 3,10-6,80



pmol/l, anti Tg At 0,0-25,3 IU/ml, za anti TPO At gornja referenta vrednost 19 IU/ml (95 % CI 17–26 IU/ml), prilagođena je referentnim vrednostima za lokalnu populaciju u Srbiji (159).

### 3.3.2. Kontrolisana ovarijalna stimulacija

Za kontrolisanu ovarijalnu stimulaciju na odeljenju ART, GAK “Narodni front” su korišćena dva protokola, dugi GnRH-a i kratak GnRH-ant protokol.

Dug GnRH-a protokol započinje se od 21.-og dana menstrualnog ciklusa, koji prethodi ciklusu u kome će se sprovesti stimulacija ovulacije, administracijom GnRH-a (Dipherelin 0,1 mg/ml, Triptorelin, Pharma Swiss Beograd, Srbija) subkutano. *Flare* efekat koji podrazumeva inicijalnu stimulaciju FSH i LH na početku terapije sa GnRH-a uzrokuje da se menstruacija obično javlja 10-ak dana posle započinjanja terapije. Prvi dan krvarenja je ujedno i prvi dan ciklusa kada će se obaviti planirana stimulacija ovulacije i odgovarajuća VTO procedura. Da bi se procenilo da li je postignuta medikamentna hipofizektomija tzv. *down* regulacija, trećeg dana ciklusa određuju se serumske vrednosti estradiola, progesterona, LH. Ukoliko su vrednosti veće od onih koje bi odgovarale medikamentnoj hipofizektomiji (estradiol < 200 pmol/l, progesteron < 2 nmol/l, LH < 5 IU/L), produžava se aplikovanje GnRH-a u istim dozama naredna 3 dana, kada se ponavlja određivanje serumskih koncentracija navedenih hormonskih analiza. Kada dostignute vrednosti hormona odgovaraju stanju medikamentne hipofizektomije nastavlja se administracija GnRH-a i započinje se stimulacija aplikacijom urinarnog hMG-a (Menopur 75i.j., Menotrofin-humani menopauzalni gonadotropin, HMG, Ferring Pharmaceuticals, Fering B.V.) i/ili rekombinantnog FSH (Gonal-F 75i.j., Folitropin alfa, Merck Serono, Modugno, Italija i/ili Puregon 50 i.j. i 100 i.j., Folitropin beta, Merck Sharp & Dohme, Beograd, Srbija) intramuskularnom (i.m.). Inicijalna doza gonadotropina zavisi od više faktora (godine starosti pacijentkinje, procenjena rezerva jajnika, odgovor na prethodne stimulacije) i određuje se individualno. Inicijalna doza se održava fiksnom prva tri dana stimulacije i kreće se od 150 do 300 i.j. gonadotropina. Nadalje, od četvrtog dana vrednosti gonadotropina se

moduliraju zavisno vrednosti estradiola u krvi uz kontinuirano praćenje rasta folikula ultrazvučnim pregledom vaginalnom sondom, koje se svakodnevno prate. Hormoni su određivani pomoću automatskog Elecsys imunoanalajzera (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Intra-esej i inter-esej koeficijenti varijacije su 3% i 6% za LH, 5% i 10% za estradiol i 3% i 5% za progesteron.

U kratkom tzv.fleksibilnom protokolu sa GnRH-ant, koristi se GnRH-ant (Cetrotide 0.25 mg/ml, Cetroreliks acetat, Merck Serono, Frankfurt, Nemačka), a radi prevencije prevremenog LH skoka. Stimulacija se započinje drugog dana menstrualnog ciklusa urinarnim (Menopur 75i.j., Menotrofin-humani menopauzalni gonadotropin, HMG, Ferring Pharmaceuticals, Ferring B.V.) i/ili rekombinantnim gonadotropinima (Gonal-F 75i.j., Folitropin alfa, Merck Serono, Modugno, Italija i/ili Puregon 50 i.j. i 100 i.j., Folitropin beta, Merck Sharp & Dohme, Beograd, Srbija), a inicijalna doza gonadotropina zavisi od više faktora (godine starosti pacijentkinje, procenjena rezerva jajnika, odgovor na prethodne stimulacije) i određuje se individualno. Inicijalna doza se održava fiksnom prva četiri dana stimulacije i kreće se od 225 do 450 i.j. gonadotropina. Nadalje, od petog dana vrednosti gonadotropina se moduliraju zavisno vrednosti estradiola u krvi uz kontinuirano praćenje rasta folikula ultrazvučnim pregledom vaginalnom sondom, koje se svakodnevno prate. Kada se dostigne porast estradiola veći od 1450 pmol/l i/ili prisustvo folikula  $\geq 14$ mm započinje se aplikacija GnRH-ant kontinuirano uz urinarni i/ili rekombinantni gonadotropin. Hormoni su određivani pomoću automatskog Elecsys imunoanalajzera (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Intra-esej i inter-esej koeficijenti varijacije su 3% i 6% za LH, 5% i 10% za estradiol i 3% i 5% za progesteron.

Kada je ultrazvučno verifikovan porast tri ili više folikula većih od 17 mm uz adekvatan porast nivoa estradiola, pristupa se postupku indukcije ovulacije ili završnoj maturaciji oocita sa 10 000 IU hCG (Pregnyl, Horionski gonadotropin, Merck Sharp & Dohme, Beograd, Srbija) ili sa Ovitrelle 250 mcg (Choriogonadotropin alfa, Merck Serono S.p.A. Modugno, Italija). U slučaju slabog odgovora jajnika (mali broj rastućih folikula) završna maturacija oocita je izazivana i ukoliko je samo 1 folikul bio veličine 17 mm. Nakon perioda od 35h posle trigeringa pristupa se aspiraciji jajnih ćelija pod kontrolom ultrazvuka (Siemens Acuson X150, Siemens Medical Solutions, USA),

korišćenjem aspiracione pumpe (Vacum pump IVF Ultra Quiet-COOK, Queensland Australija) i igle za aspiraciju jajnih ćelija sa duplim lumenom (Cook EchoTip Double Lumen Aspiration Needle). Na dan aspiracije oocita iz folikula  $\geq 17$  mm uzima se 1-2 ml folikularne tečnosti u kojoj se određuju TSH,  $fT_4$ , anti TPO At, anti Tg At i progesteron. Hormonske analize i tiroidna autoantitela su određivani u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku "Konzilijum" u Beogradu, na automatskom analizatoru Cobas 6000 firme ROCHE, komercijalnim testovima iste firme baziranim na principu imuno-hemiluminiscentne metode.

### **3.3.3. Kultivacija jajnih ćelija, fertilizacija i embriotransfer**

U tekstu koji sledi, opisan je postupak odlaganja jajnih ćelija u inkubator sa odgovarajućim medijumom, postupak fertilizacije do embriotransfera (ET), koji se sprovodi na odeljenju ART, GAK "Narodni front".

Jajne ćelije dobijene aspiracijom stavljaju se u specijalne posude sa odgovarajućim medijumom i odlažu u inkubator na strogo kontrolisanoj temperaturi. Medijum korišćen za kulturu humanih gameta i embriona je Cook Medical Embryo Culture Sequential System, Fertilization medium i Cleavage medium (Cook<sup>®</sup> Medical Inc., Ireland), a inkubatori primenjeni za ekvibraciju medijuma i za kultivaciju jajnih ćelija i embriona su konvencionalni inkubator sa vratima napred i vodenim sistemom grejanja, Heracell 240 (Thermo Electron Corporation, Made in Germany) i mali inkubator sa vratima na gore, K-MINK 1000 (William a COOK Australia Pty Ltd). Za kolekciju i fertilizaciju jajnih ćelija koristi se Fertilization Medium (Cook<sup>®</sup> Medical Inc., Ireland). Shodno indikacijama, koristi se jedan od dva metoda-klasičan metod VTO (IVF) ili ICSI.

Kod klasičnog metoda VTO (IVF) postupak je sledeći: nakon aspiracije folikula, dobijene jajne ćelije se isperu i prebace (maksimalno do 5 jajnih ćelija) u 700  $\mu$ L Fertilization medium, gde se vrši inseminacija. Prethodno navedeno predstavlja prvi deo sekvencijalnog *in vitro* protokola kulture embriona. Inseminacija se sprovodi sa 100.000 progresivno pokretnih spermatozoida iz svežeg ejakulata. Narednog jutra, sledi proces

čišćenja ćelija *corona cumulus* kompleksa, a nakon potvrde fertilizacije, očišćene ćelije prenose se u 50µl prethodno ekvilibrisane kapi Cleavage Medium (Cook<sup>®</sup> Medical Inc., Ireland), optimalnog za rani razvoj embriona. To je drugi deo sekvencijalnog *in vitro* protokola kulture embriona od faze zigota (prvi dan), do drugog ili trećeg dana kultivacije, odnosno do ET.

Kod ICSI metode, prikupljanje jajnih ćelija se takođe obavlja u Fertilization Mediumu. Po sprovedenom postupku mikrofertilizacije vrši se prebacivanje u mikrokapi prethodno ekvilibrisanog Cleavage Medium, u tzv.drugom delu sekvencijalnog *in vitro* protokola kulture embriona od faze zigota (prvi dan), do drugog ili trećeg dana kultivacije, odnosno do ET. U ugljen dioksid (CO<sub>2</sub>) inkubatorima: Heracell 240, u atmosferi od 6% čistog CO<sub>2</sub> i na temperaturi od 37°C za Cook medijume urađena je ekvilibracija medijuma, kultura gameta i embriona, dok je kultura embriona vršena u K-MINK 1000 inkubatorima, obavljana u tačno određenoj atmosferi smeše gasova koja sadrži 6,1% CO<sub>2</sub>, 5% kiseonik (O<sub>2</sub>) i ostatak azot (N<sub>2</sub>) i na temperaturi od 37°C.

Nakon 16-20 sati pristupa se proveriti fertilizacije jajnih ćelija, koja se potvrđuje prisustvom dva pronukleusa (haploidno jedro jajne ćelije i spermatozoida, 2PN) sa dva jasna, (vidljiva, posebna) ili fragmentisana polarna tela. Razvoj embriona se svakodnevno prati, a isti su bili kultivisani u kapima ispod ulja (Ovoil, Vitrolife, Göteborg, Sweden). ET se sprovodio drugog ili trećeg dana posle aspiracije jajnih ćelija.

### **3.3.3.1. Određivanje kvaliteta embriona**

U daljem laboratorijskom protokolu, pristupa se određivanju kvaliteta embriona. Korišćeni su sledeći kriterijumi: broj blastomera, oblik blastomera (pravilne ili nepravilne), veličina blastomera (jednake ili nejednake), stopa fragmentacije (procenat fragmentacije embriona) i multinukleacija blastomera. Prema stopi fragmentacije embrioni mogu biti bez fragmenata, embrioni sa ≤10% fragmenata, embrioni sa ≤ 20% fragmenata, embrioni sa >20 i ≤ 50 % i embrioni sa > 50 -100% fragmenata. Ukoliko

su blastomere međusobno jednake, to se označava kao A skor embriona, a ukoliko nisu kao B skor. Prefix 1,2,3,4... ispred A ili B označava broj blastomera prisutnih u embrionu (npr. 3A, i 3B, tri blastomere).

Kriterijumi za određivanje kvaliteta embriona su:

A embrion - ima blastomere jednake po veličini (2-8) bez fragmenata i bez multinukleacije

B embrion - ima blastomere nejednake po veličini (2-8) bez fragmenata i bez multinukleacije

A1; B1 - embrioni sa  $\leq 10$  % fragmentacija, a mogu biti sve kombinacije sa prefiksom koji označava broj blastomera 2A1,2B1, 3A1,4A1....8A1; 2B1, 3B1..8B1.

A2; B2 - embrioni sa  $>10$  i  $\leq 20$  % fragmentacija, a mogu biti sve kombinacije sa prefiksom koji označava broj blastomera 2A2,2B2, 3A2,4A2....8A2; 2B2, 3B2..8B2.

A3; B3 -embrioni sa  $>20$  do 50% fragmenata

A4; B4 - embrioni sa  $> 50$  % fragmenata

Na osnovu kvaliteta embriona, shodno prethodno navedenim kriterijumima, gradiraju se na sledeći način:

1. Odličan embrion vrhunskog kvaliteta (*Top quality*)- A embrioni i B koji su drugog dana imali 3-4 blastomere, odnosno trećeg dana 6-8 blastomera; A1 i B1 embrioni koji su drugog dana imali 3-4 blastomere, odnosno trećeg dana 6-8 blastomera.

2. Embrion koji je dobrog kvaliteta (*Good quality*)-A i B embrioni sa odgovarajućim brojem blastomera i stepena fragmentacije i sa odsustvom multinukleacije; svi A2 embrioni i B2 embrioni sa 2-8 blastomera.

3. Embrioni prosečnog -osrednjeg kvaliteta (*Fair quality*) -A3 embrioni i B3 embrioni.

4. Embrioni lošeg tj. nepovoljnog kvaliteta koji nisu za transfer (*Bad quality*)-A4 embrioni i B4 embrioni; embrioni koji su usporenog rasta ili sa prisutnim zastojeom u razvoju (na primer embrioni trećeg dana sa 4 ili 5 blastomera); embrioni sa izraženom multinukleacijom.

Drugi dan selekcija embriona za embriotransfer procenjena je u skladu sa prethodno navedenim parametrima. Treći dan selekcija embriona za embriotransfer procenjena je u skladu sa prethodno navedenim parametrima, uz prednost onih embriona koji su pokazali ranu kompakciju.

#### **3.3.4. Podrška lutealne faze**

Progesteron se koristio za podršku lutealne faze i to peroralno u dozi 3 x 200 mg (Utrogestan, Besins, Brussels, Belgium) i 125 mg depo preparata progesterona intramuskularno (i.m.) (Progesteron depo 250 mg, hidrokspirogesteron kaproata, Galenika, Beograd, Srbija) na dan aspiracije jajnih ćelija i svaki dan do ET uključujući i dan ET i još 2 puta na peti dan od ET po 250 mg depo preparata progesteron i.m.

#### **3.3.5. Dizajn studijske populacije**

Na osnovu prisustva tiroidnih autoantitela (anti TPO At i/ili anti Tg At) u perifernoj krvi, pacijentkinje su podeljene u dve grupe. Kao kriterijum za ulazak u ispitivanu grupu, uzete su serumske vrednosti anti TPO At iznad gornje referentne vrednosti za anti TPO At 19 IU/ml (95 % CI 17–26 IU/ml), prilagođene referentnim vrednostima za lokalnu populaciju u Srbiji (159) i/ili serumske vrednosti anti Tg At iznad gornje referentne vrednosti za anti Tg At 25,3 IU/ml, shodno standardnim referentnim vrednostima Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku "Konzilijum" u Beogradu.

Ispitivanu grupu (TAI Da), činile su pacijentkinje (26) koje su ušle u program VTO, a koje su imale samo pozitivna tiroidna autoantitela (anti TPO At i/ili anti Tg At) u perifernoj krvi i one koje su pored TAI imale i hipotiroidizam, a terapijom je postignuto eutiroidno stanje. Kriterijum za eutiroidno stanje je serumska vrednost TSH u referentnim granicama 0,40-4,00  $\mu$ IU/ml. Na terapiji levotiroksinom bilo je 20 pacijentkinja TAI Da grupe.

Kontrolnu grupu (TAI Ne), činio je isti broj eutiroidnih pacijentkinja (26) koje su ušle u program VTO, a nisu imale pozitivna tiroidna autoantitela u perifernoj krvi.

### **3.3.6. Podaci uključeni u analizu**

Analizirani su sledeći podaci o pacijentkinjama: starost, životne navike-pušenje i konzumiranje kafe, porodična anamneza za autoimune bolesti, lična anamneza za autoimune bolesti, vitiligo i polensku kijavicu, BMI, primarni/sekundarni infertilitet, paritet, etiologija infertiliteta (tubarni faktor, endometrioza, PCOS, infertilitet nepoznatog uzroka, mešoviti infertilitet, muški faktor), trajanje infertiliteta, raniji spontani pobačaj, prethodno urađena VTO, AMH, broj antralnih folikula, a u ispitivanoj grupi vreme postavljanja dijagnoze u odnosu na ispitivanje, trajanje terapije i doza preparata levotiroksina, eho pregled tiroidne žlezde, volumen lobusa, prisustvo i veličina nodusa.

Praćeni su sledeći podaci vezani za postupak VTO: vrste protokola stimulacije, metod fertilizacije, dužina stimulacije, ukupna količina gonadotropina primenjenih tokom stimulacije, serumske vrednosti estradiola na dan završne injekcije, spermogram na dan aspiracije jajnih ćelija, broj jajnih ćelija, broj i procenat kvalitetnih jajnih ćelija, stopa fertilizacije, ukupan broj embriona, broj *top quality* embriona, broj transferisanih embriona, dan ET, stopa implantacije. Kvalitetne jajne ćelije su oplodene jajne ćelije iz IVF, a MII jajne ćelije iz ICSI-a, dok je procenat kvalitetnih jajnih ćelija računat kao broj kvalitetnih jajnih ćelija podeljen sa ukupnim brojem jajnih ćelija i pomnoženo sa 100. Stopa fertilizacije je računata kod IVF kao broj oplodjenih jajnih ćelija podeljen brojem jajnih ćelija odvojenim za IVF pomnoženo sa 100, a kod ICSI metoda kao broj oplodjenih jajnih ćelija podeljen brojem MII jajnih ćelija, pomnoženo sa 100. Kada su rađeni i IVF i ICSI kod iste pacijentkinje, jedan deo ćelija je odvojen za ICSI, drugi deo za IVF, a za izračunavanje navedenih parametara jajne ćelije iz oba metoda su sabirane i dalje računanje je urađeno shodno prethodno navedenom. Stopa implantacije je računata kao broj gestacionih meškova utvrđenih ultrazvučnim pregledom vaginalnom sondom podeljen sa brojem transferisanih embriona, pomnoženo sa 100.

### 3.3.7. Ishod vantelesne oplodnje

Ocena uticaja TAI na ishod VTO je posmatrana kroz broj biohemijskih i kliničkih trudnoća. Biohemijska trudnoća je potvrđena određivanjem  $\beta$  subjedinice hCG > 50 mIU/ml 16 dana od aspiracije jajnih ćelija, a potom klinička trudnoća ultrazvučno utvrđena u sedmoj gestacijskoj nedelji (dijagnostikovana ultrazvučnim pregledom vaginalnom sondom, pri čemu je utvrđeno prisustvo gestacionog meška ili otkucaja srca ploda), gemelarna trudnoća, rani spontani pobačaji (spontani gubici trudnoće od sedme do dvanaeste nedelje gestacije).

### 3.4. Statistička metodologija

Za računanje veličine uzorka korišćen je G\*Power i sledeći parametri: dvosmerni test, alpha greška 0.05, snaga 0.7. Izračunata veličina uzorka 52 ispitanice (160).

U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode.

Od deskriptivnih korišćeni su:

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

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su testovi razlike:

- parametarski (t test)
- neparametarski (Hi-kvadrat test, Fišerov test tačne verovatnoće, Mann-Whitney U test).

Izbor testa za testiranje razlike zavisio je od tipa podataka i raspodele.

Obeležja posmatranja koja nisu imala normalnu raspodelu su transformisana pomoću logaritamske transformacije i kao transformisana korišćena za dalje modelovanje.

Zbog malog broja jedinica posmatranja u pojedinim analizama, korišćeni su egzaktni testovi ili Monte Karlo simulacija sa intervalom poverenja od 99% i 10000 uzoraka.



Za analizu povezanosti korišćena je korelaciona i regresiona analiza. Korelaciona analiza obuhvatila je Pirsonovu (linernu) i Spirmanovu (rangovnu) analizu, a izbor je bio u zavisnosti od tipa obeležja posmatranja i raspodele podataka.

Logistička regresiona analiza, univarijantna i multivarijantna korišćene su za predikciju ishoda. U multivarijantnim modelima, multikolinearnost je testirana pomoću VIF (*variance inflation factor*). Kalibracija modela testirana je pomoću Hosmer-Lemeshow testa. Verovatnoća manja od 0,05 je uzeta kao verovatnoća za odbacivanje nulte hipoteze.

Rezultati su prikazani tabelarno i/ili grafički.

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

#### 4. REZULTATI

U studiju je ušlo ukupno 52 pacijentkinje, 26 koji imaju pozitivnu TAI i 26 koji nemaju. U trenutku ulaska u studiju sve pacijentkinje su bile nulipare, osim jedne koja je bila unipara. Takođe, sve pacijentkinje su imale primarni infertilitet, osim jedne sa sekundarnim infertilitetom. Prosečna starost svih ispitanica iznosi  $34,3 \pm 3,6$  godina. Najmlađa pacijentkinja ima 24 godine, a najstarija 40 godina.

##### Starost

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

*Tabela 4. Starost pacijentkinja*

Tiroidna autoimunost	Aritmetička sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum
Da	34,6	3,5	34	26	40
Ne	33,9	3,8	34	24	40
Ukupno	34,3	3,6	34	24	40

Iz tabele se vidi da je prosečna starost vrlo slična u obe ispitivane grupe, a statističkom analizom je utvrđeno da nema značajne razlike između ispitivanih grupa ( $t=0,719$ ;  $p=0,476$ ).

##### Antropometrija

Za svaku pacijentkinju računat je BMI po formuli telesna masa (TM) u kg podeljena sa kvadratom telesne visine (TV) u metrima.

Deskriptivna statistika antropometrijskih parametara po ispitivanim grupama, kao i kod svih pacijentkinja zajedno, prikazana je u tabeli 5.

*Tabela 5. Antropometrija*

	Tiroidna	Aritmetička				
	autoimunost	sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum
TM (kg)	Da	66,8	8,1	65,7	53,1	84,4
	Ne	62,3	8,9	62,4	46,7	84,0
	Ukupno	64,5	8,7	64,0	46,7	84,4
TV (cm)	Da	169,3	4,2	169,0	163	179
	Ne	167,1	6,6	166,5	158	181
	Ukupno	168,2	5,6	168,0	158	181
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Da	23,3	2,7	23,2	19,0	28,1
	Ne	22,3	2,7	21,6	18,5	29,4
	Ukupno	22,7	2,7	22,8	18,5	29,4

Na osnovu analize antropometrijskih parametara, sa posebnim fokusom na BMI, utvrđeno je da su isti vrlo slični u obe ispitivane grupe. Statističkom analizom nije dobijena značajna razlika između grupa ( $t=1,367$ ;  $p=0,178$ ).

### Navike

Distribucija pacijentkinja po navikama (pušenje, konzumiranje kafe) je prikazana u tabeli 6.

*Tabela 6. Navike*

		Tiroidna autoimunost			
		Da		Ne	
		N	%	N	%
Pušenje	Ne	21	80,8%	15	57,7%
	Da	5	19,2%	11	42,3%
Konzumiranje kafe	Ne	1	3,8%	2	7,7%
	Da	25	96,2%	24	92,3%

Evidentno je da je pušenje više zastupljeno u grupi pacijentkinja koje nemaju tiroidnu autoimunost 42,3% vs. 19,2% u grupi sa TAI, ali bez statistički značajne razlike

( $X^2=3,250$ ;  $p=0,132$ ). Za razliku od pušenja, konzumiranje kafe je gotovo identično u obe ispitivane grupe ( $X^2=0,354$ ;  $p=1,000$ ).

Porodična anamneza za autoimune bolesti i lična anamneza za druge autoimune bolesti, vitiligo i polensku kijavicu

Distribucija pacijentkinja u odnosu na pozitivnu, odnosno negativnu porodičnu anamnezu (PA) za autoimune bolesti i ličnu anamnezu (LA) za druge autoimune bolesti, vitiligo i polensku kijavicu je prikazana u tabeli 7.

*Tabela 7. Porodična i lična anamneza*

		Tiroidna autoimunost			
		Da		Ne	
		N	%	N	%
PA za autoimune	-	19	73,1%	24	92,3%
bolesti	+	7	26,9%	2	7,7%
LA za druge	-	22	84,6%	23	88,5%
autoimune bolesti,	+	4	15,4%	3	11,5%
vitiligo, polensku					
kijavicu					

Evidentno je da je distribucija po ličnoj anamnezi vrlo slična, dok je razlika u procentima dosta veća kod porodične anamneze i to 26,9% u grupi koja ima i 7,7% u grupi koja nema TAI. Ipak, statističkom analizom nije dobijena značajna razlika između ispitivanih grupa po porodičnoj anamnezi ( $X^2=3,359$ ;  $p=0,140$ ), kao ni po ličnoj anamnezi ( $X^2=0,165$ ;  $p=1,000$ ).

Trajanje infertiliteta do ulaska u studiju

U tabeli 8 prikazana je deskriptivna statistika trajanja infertiliteta do ulaska u studiju po ispitivanim grupama.

*Tabela 8. Trajanje infertiliteta do ulaska u studiju*

Tiroidna autoimunost	Aritmetička				
	sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum
Da	51,5	22,0	48,5	14	96
Ne	77,0	50,3	66,0	24	240
Ukupno	64,3	40,5	54,0	14	240

Iz dobijenih rezultata se vidi da je prosečno trajanje infertiliteta do ulaska u studiju duže u grupi pacijentkinja koje nemaju TAI  $77,0 \pm 50,3$  vs.  $51,5 \pm 22,0$  meseca u grupi sa TAI. Ova razlika je na samoj granici konvencionalnog nivoa značajnosti pa je možemo smatrati značajnom ( $Z = -1,956$ ;  $p = 0,050$ ).

#### Raniji spontani pobačaj

Distribucija pacijentkinja u odnosu na ranije spontane pobačaje po ispitivanim grupama je prikazana u tabeli 9.

*Tabela 9. Raniji spontani pobačaj*

			Raniji spontani pobačaj		
			Ne	Da	Ukupno
Tiroidna autoimunost	Da	N	24	2	26
		%	92,3%	7,7%	100,0%
	Ne	N	23	3	26
		%	88,5%	11,5%	100,0%
Ukupno	N	47	5	52	
	%	90,4%	9,6%	100,0%	

Iz tabele se vidi da je procenat ranijih spontanih pobačaja sličan u obe ispitivane grupe. Statističkom analizom je utvrđeno da nema značajne razlike između grupa ( $X^2 = 0,221$ ;  $p = 0,638$ ).

### Prethodni pokušaji postizanja fertiliteta metodom vantelesne oplodnje

U tabeli 10 prikazana je distribucija pacijentkinja prema prethodnim pokušajima postizanja fertiliteta metodom VTO po ispitivanim grupama.

*Tabela 10. Prethodna vantelesna oplodnja*

		Prethodna VTO		Ukupno	
		Ne	Da		
Tiroidna autoimunost	Da	N	19	7	26
		%	73,1%	26,9%	100,0%
	Ne	N	17	9	26
		%	65,4%	34,6%	100,0%
Ukupno		N	36	16	52
		%	69,2%	30,8%	100,0%

Iz tabele se vidi da je procenat prethodnih VTO veći u grupi pacijentkinja koje nemaju TAI 34,6%, a grupi pacijentkinja koje imaju TAI 26,9%, ali ova razlika nije statistički značajna ( $X^2=0,361$ ;  $p=0,548$ ).

### Karakteristike pacijentkinja sa tiroidnom autoimunošću

Među 26 pacijentkinja ispitivane grupe sa TAI, njih 16 (61,54%) je imalo od ranije postavljenu dijagnozu hipotireoze na bazi HT, 4 (15,38%) pacijentkinje HT. Ovih 20 pacijentkinja su bile od ranije na supstituciji levotiroksinom. Kod 6 (23,08%) pacijentkinja povišena tiroidna autoantitela (anti TPO At i/ili anti Tg At) su dijagnostikovana tokom studije.

U tabeli 11 prikazana je deskriptivna statistika vremena postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje (posebno sa novootkrivenim, a posebno bez novootkrivenih pacijentkinja), dnevna doza levotiroksina i dužina uzimanja terapije, u mesecima, kod pacijentkinja koje su na terapiji.

*Tabela 11. Karakteristike pacijenata sa tiroidnom autoimunošću*

	Aritmetička					
	N	sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum
Vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje (meseci)	26	36,31	40,12	24	0	134
Vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje (meseci) bez novootkrivenih pacijentkinja	20	47,20	39,71	37	7	134
Terapija levotiroksin (mcg)	20	67,49	29,40	59,82	25	125
Trajanje terapije (meseci)	20	33,00	36,51	19,50	4	134

Tabela 12 prikazuje serumske vrednosti TSH, fT<sub>4</sub> i fT<sub>3</sub> u podgrupama TAI grupi zavisno od terapije levotiroksinom.

*Tabela 12. Serumski parametri i terapija levotiroksinom*

		Terapija levotiroksin					
		Aritmetička					
		N	sredina	SD	Median	Perc.25	Perc.75
TSH u serumu (µIU/ml)	ne	6	1,90	,43	2,04	1,68	2,23
	da	20	1,56	,70	1,35	1,01	2,21
fT <sub>4</sub> u serumu (pmol/l)	ne	6	16,52	3,52	16,57	16,20	17,73
	da	20	20,98	2,93	20,74	18,76	22,97
fT <sub>3</sub> u serumu (pmol/l)	ne	6	5,39	,98	5,23	4,79	6,07
	da	20	4,75	,51	4,77	4,37	5,23

Nije bilo statistički značajnih razlika u odnosu na TSH (p=0,324) i fT<sub>3</sub> (p=0,135), ali je postojala značajna razlika u odnosu na fT<sub>4</sub> (p=0,006) u smislu viših prosečnih vrednosti u podgrupi sa TAI, gde je primenjena terapija levotiroksinom.

### Eho pregled štitaste žlezde

Posmatrane su sledeće karakteristike eho pregleda štitaste žlezde: ehogenost tiroidnog tkiva (hipoehogen, normoehogen, hiperehogen), ehogena struktura žlezde (homogenost ili nehomogenost) i prokrvljenost parenhima određena putem CD signala (*Colour Doppler*) (slabija, normalna ili pojačana prokrvljenost). Meren je volumen desnog (DL) i levog lobusa (LL) i procenjeno eventualno prisustvo i veličina fokalnih ultrazvučnih promena (nodusa).

U tabeli 13 prikazana je distribucija pacijentkinja u odnosu na eho pregled tiroidne žlezde.

*Tabela 13. Eho nalaz štitaste žlezde*

		N	%
Ehoga struktura žlezde	Homogen	4	15,4%
	Lako nehomogen	2	7,7%
	Nehomogen	20	76,9%
Ehogenost tkiva žlezde	Hipoehogen	16	61,5%
	Lako hipoehogen	7	26,9%
	Normoehogen	3	11,5%
Prokrvljenost	Normalno prokrvljen	16	61,5%
	Jače prokrvljen	1	3,8%
	Slabije prokrvljen	9	34,6%

Najveći procenat pacijentkinja je imao nehomogenu (76,9%), hipoehogenu (61,5%) i normalno prokrvljenu (61,5%) tiroidnu žlezdu.

Deskriptivna statistika volumena lobusa je prikazana u tabeli 14.

*Tabela 14. Volumen lobusa*

	Aritmetička				
	sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum
Volumen DL (cm <sup>3</sup> )	4,21	1,88	4,20	0,8	9,0
Volumen LL (cm <sup>3</sup> )	3,97	2,42	3,35	1,0	10,8



Prosečan volumen DL je nešto veći od levog LL.

Od ukupno 26 pacijenata koji imaju TAI, njih 8 (30,8%) ima noduse, od kojih 6 pacijentkinja ima noduse veličine manje od 1cm, dok 2 pacijentkinje imaju noduse veličine veće od 1cm.

### Etiologija infertiliteta

Distribucija pacijentkinja u odnosu na etiologiju infertiliteta prema ispitivanim grupama prikazana je u tabeli 15.

*Tabela 15. Etiologija infertiliteta*

		Etiologija infertiliteta					Ukupno
		Muški	Ženski	Mešoviti	infertilitet nepoznatog uzroka		
Tiroidna autoimunost	Da	N	14	4	2	6	26
		%	53,8%	15,4%	7,7%	23,1%	100,0%
	Ne	N	8	6	5	7	26
		%	30,8%	23,1%	19,2%	26,9%	100,0%
Ukupno		N	22	10	7	13	52
		%	42,3%	19,2%	13,5%	25,0%	100,0%

Evidentno je da postoji razlika u distribuciji etiologije infertiliteta, a ona se najviše ogleda u procentu muškog uzroka (53,5% TAI Da vs. 30,8% TAI Ne) i mešovitog (7,7% TAI Da vs. 19,2% TAI Ne), nešto manje u ženskom (15,4% TAI Da vs. 23,1% TAI Ne).

Ipak, statističkom analizom je utvrđeno da ova razlika nije statistički značajna ( $X^2=3,399$ ;  $p=0,349$ ).

Takođe, kada se posmatra distribucija etiologije infertiliteta u grupama, uzimajući u obzir i pojedinačne uzroke ženskog infertiliteta, nije nađena statistički značajna razlika između TAI da i ne grupe,  $X^2=6,999$ ;  $p=0,228$  (tabela 16).

*Tabela 16. Etiologija infertiliteta*

		Etiologija infertiliteta							Ukupno
		muški faktor	infertilitet nepoznatog uzroka	mešoviti	Endometrioza	PCOS	tubarni faktor		
Tiroidna autoimunost	Da	N	14	6	2	1	2	1	26
		%	53,8%	23,1%	7,7%	3,8%	7,7%	3,8%	100,0%
	Ne	N	8	7	5	3	0	3	26
		%	30,8%	26,9%	19,2%	11,5%	0,0%	11,5%	100,0%
Ukupno		N	22	13	7	4	2	4	52
		%	42,3%	25,0%	13,5%	7,7%	3,8%	7,7%	100,0%

### Endometrioza

U tabeli 17 prikazana je distribucija pacijentkinja prema ispitivanim grupama u odnosu na endometriozu.

*Tabela 17. Endometrioza*

		Endometrioza			
		Ne	Da	Ukupno	
Tiroidna autoimunost	Da	N	25	1	26
		%	96,2%	3,8%	100,0%
	Ne	N	21	5	26
		%	80,8%	19,2%	100,0%
Ukupno		N	46	6	52
		%	88,5%	11,5%	100,0%

Evidentna je razlika između ispitivanih grupa u korist pacijentkinja koje nemaju TAI i to 19,2%, a među pacijentkinjama koje imaju TAI 3,8% ali ova razlika nije statistički značajna ( $X^2=3,014$ ;  $p=0,191$ ).

### Sindrom policističnih jajnika

U tabeli 18 prikazana je distribucija pacijentkinja prema ispitivanim grupama u odnosu na PCOS.

*Tabela 18. Sindrom policističnih jajnika*

		PCOS			
		Ne	Da	Ukupno	
Tiroidna autoimunost	Da	N	22	4	26
		%	84,6%	15,4%	100,0%
	Ne	N	25	1	26
		%	96,2%	3,8%	100,0%
Ukupno		N	47	5	52
		%	90,4%	9,6%	100,0%

Kao i u prethodnoj analizi, postoji evidentna razlika u procentima, ovog puta u korist grupe koja ima TAI 15,4%, a u grupi koja nema TAI 3,8%, ali ni ova razlika nije statistički značajna ( $X^2=1,991$ ;  $p=0,350$ ).

### Broj antralnih folikula i anti-Müllerian hormon

Distribucija pacijentkinja u ispitivanim grupama u odnosu na markere ovarijalne reserve kao što su broj antralnih folikula i AMH je prikazana u tabeli 19.

*Tabela 19. Broj antralnih folikula i anti-Müllerian hormon*

		TAI					Mann-Whitney U test	
		Aritmetička			Median	Minimum		Maksimum
		N	sredina	SD				
Broj antralnih folikula	Ne	26	10,92	7,06	9,00	1,00	30,00	Z=-0,954
	Da	26	14,35	9,65	12,00	2,00	30,00	p=0,340
AMH (ng/ml)	Ne	26	2,16	1,47	1,69	,34	6,00	Z=-0,860
	Da	26	2,66	1,84	2,48	,24	6,71	p=0,390
AMH/gornja referentna granica za godine (%)	Ne	26	33,10	22,13	29,60	5,10	88,20	
	Da	26	46,71	37,54	35,30	4,10	159,80	Z=-1,144 p=0,253

Nema statistički značajne razlike između ispitivanih grupa po broju antralnih folikula ( $Z=-0,954$ ;  $p=0,340$ ) kao ni AMH ( $Z=-0,860$ ;  $p=0,390$ ) niti % AMH u odnosu na gornji referentni opseg ( $Z=-1,144$ ;  $p=0,253$ ).

### Protokol

Distribucija pacijentkinja prema protokolu u ispitivanim grupama je prikazana u tabeli 20.

*Tabela 20. Protokol*

		Protokol			
			Kratki	Dugi	Ukupno
Tiroidna autoimunost	Da	N	16	10	26
		%	61,5%	38,5%	100,0%
	Ne	N	19	7	26
		%	73,1%	26,9%	100,0%
Ukupno	N	35	17	52	
	%	67,3%	32,7%	100,0%	

Nema statistički značajne razlike između ispitivanih grupa po protokolu ( $X^2=0,787$ ;  $p=0,375$ ). Naime, dugi protokol je u nešto većem procentu u grupi

pacijentkinja sa TAI 38,5%, a u grupi bez TAI 26,9%, ali ova razlika nije statistički značajna.

### Broj dana stimulacije

U tabeli 21 je prikazana deskriptivna statistika broja dana stimulacije po ispitivanim grupama.

*Tabela 21. Broj dana stimulacije*

Tiroidna autoimunost	Aritmetička				
	sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum
Da	10,77	1,31	10	9	14
Ne	10,23	1,17	10	8	14
Ukupno	10,50	1,26	10	8	14

Kao što se vidi iz tabele, prosečne vrednosti su gotovo identične. Statističkom analizom je utvrđeno da nema značajne razlike između ispitivanih grupa ( $t=1,562$ ;  $p=0,125$ ).

### Ukupna količina gonadotropina

Deskriptivna statistika ukupne količine gonadotropina primenjenih tokom stimulacije po ispitivanim grupama je prikazana u tabeli 22.

*Tabela 22. Ukupna količina gonadotropina*

Tiroidna autoimunost	Aritmetička				
	sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum
Da	2414,4	698,2	2487,5	1250	3750
Ne	2567,3	607,3	2612,5	1125	3675
Ukupno	2490,8	652,4	2550,0	1125	3750

Na osnovu dobijenih rezultata je utvrđeno da nema statistički značajne razlike između ispitivanih grupa po ukupnoj količini gonadotropina primenjenih tokom stimulacije ( $t=-0,842$ ;  $p=0,404$ ).

### Serumski estradiol na dan završne injekcije

U tabeli 23 prikazana je deskriptivna statistika serumskog estradiola na dan završne injekcije po ispitivanim grupama.

*Tabela 23. Serumski estradiol na dan završne injekcije (pmol/l)*

Tiroidna autoimunost	Aritmetička				
	sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum
Da	7068,7	2808,7	7570,0	1167	11560
Ne	6718,7	3122,2	6385,5	935	11374
Ukupno	6893,7	2945,6	7244,5	935	11560

Kao i u prethodnim analizama, i ovde nema značajne razlike između ispitivanih grupa ( $Z=-0,494$ ;  $p=0,621$ ). Naime, prosečna vrednost je nešto veća u grupi pacijentkinja sa TAI, ali obzirom da je varijabilitet jako veliki, ova razlika nije značajna.

### Metod fertilizacije (VTO)

U tabeli 24 prikazana je distribucija pacijentkinja u odnosu na metod fertilizacije po ispitivanim grupama.

*Tabela 24. Metod fertilizacije*

Tiroidna autoimunost		Metod fertilizacije		
		ICSI	IVF/ICSI	Ukupno
Da	N	17	9	26
	%	65,4%	34,6%	100,0%
Ne	N	19	7	26
	%	73,1%	26,9%	100,0%
Ukupno	N	36	16	52
	%	69,2%	30,8%	100,0%

Kao i u prethodnoj analizi i ovde postoji mala razlika u procentima, koja nije statistički značajna ( $X^2=0,361$ ;  $p=0,548$ ).

### Spermogram na dan aspiracije jajnih ćelija

Analogno prethodnim analizama, ispitivana je i distribucija spermograma na dan aspiracije jajnih ćelija, po ispitivanim grupama (Tabela 25).

*Tabela 25. Spermogram na dan aspiracije jajnih ćelija*

		Spermogram na dan aspiracije jajnih ćelija			
		Normalan	Patološki	Ukupno	
Tiroidna autoimunost	Da	N	8	18	26
		%	30,8%	69,2%	100,0%
	Ne	N	5	21	26
		%	19,2%	80,8%	100,0%
Ukupno		N	13	39	52
		%	25,0%	75,0%	100,0%

Procenat patološkog spermograma na dan aspiracije jajnih ćelija je sličan u obe ispitivane grupe, sa nešto većim procentom kod pacijenata koji nemaju TAI, ali ova razlika nije statistički značajna ( $X^2=0,923$ ;  $p=0,337$ ).

### TSH, fT<sub>4</sub> i fT<sub>3</sub> u serumu

Deskriptivna statistika pacijentkinja po ispitivanim grupama u odnosu na TSH, fT<sub>4</sub> i fT<sub>3</sub> u serumu je prikazana u tabeli 26.

*Tabela 26. TSH, fT<sub>4</sub>, fT<sub>3</sub> u serumu*

	Tiroidna	Aritmetička					Rezultati testiranja
	autoimunost	sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum	
TSH u serumu (μIU/ml)	Da	1,63	,65	1,58	,57	2,73	t=-2,670 p=0,010
	Ne	2,22	,89	2,11	,61	3,89	
	Ukupno	1,93	,83	1,93	,57	3,89	
fT <sub>4</sub> u serumu (pmol/l)	Da	19,95	3,56	19,74	10,55	26,83	t=2,783 p=0,008
	Ne	17,76	1,84	17,64	12,91	21,46	
	Ukupno	18,86	3,02	18,27	10,55	26,83	
fT <sub>3</sub> u serumu (pmol/l)	Da	4,89	,68	4,79	3,87	6,90	t=-3,681 p=0,001
	Ne	5,51	,49	5,64	4,53	6,29	
	Ukupno	5,20	,66	5,19	3,87	6,90	

Iz tabele se jasno vidi da su sve tri razlike statistički značajne. Naime, prosečne vrednosti TSH su značajno veće u grupi pacijentkinja koje nemaju TAI (2,22±0,89 vs. 1,63±0,65 μIU/ml), kao i fT<sub>3</sub> (5,51±0,49 vs. 4,89±0,68 pmol/l). Nasuprot, prosečna vrednost fT<sub>4</sub> (19.95±3.56 vs. 17.76±1.84 pmol/l) je značajno veća u grupi pacijentkinja koje imaju TAI.

#### Tiroidna autoantitela u serumu

Deskriptivna statistika serumskih anti TPO At kao i anti Tg At prikazana je u tabeli 27.

*Tabela 27. Serumska anti TPO At i anti Tg At*

	Tiroidna	Aritmetička					Rezultati testiranja
	autoimunost	sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum	
Serumska anti TPO At (IU/ml)	Da	127,33	157,39	56,50	5,50	600,00	Z=-4,100 p<0,001
	Ne	12,23	3,89	11,35	6,80	25,50	
	Ukupno	69,77	124,61	13,75	5,50	600,00	
Serumska anti Tg At (IU/ml)	Da	317,86	615,09	66,14	9,00	2380,00	Z=-5,479 p<0,001
	Ne	10,89	3,56	9,00	9,00	22,99	
	Ukupno	164,37	457,69	14,26	9,00	2380,00	



Kada su u pitanju serumska antitela, evidentna je veoma velika razlika između ispitivanih grupa, koja je u oba slučaja statistički značajna. Naime, koncentracija antitela je daleko veća u grupi pacijentkinja sa TAI u odnosu na grupu pacijentkinja bez TAI za: anti TPO At med=56,50 (5,50-600,00 IU/ml) vs. 11,35 (6,80-25,50 IU/ml), anti Tg At med=66,14 (9,00-2380,00 IU/ml) vs. 9,00 (9,00-22,99 IU/ml),  $p < 0,001$ .

#### TSH i fT<sub>4</sub> u folikularnoj tečnosti

Deskriptivna statistika pacijentkinja po ispitivanim grupama u odnosu na vrednost TSH i fT<sub>4</sub> u folikularnoj tečnosti je prikazana u tabeli 28.

*Tabela 28. TSH i fT<sub>4</sub> u folikularnoj tečnosti*

	Tiroidna autoimunost		Aritmetička				Rezultati testiranja	
	Da	Ne	sredina	SD	Median	Minimum		Maksimum
TSH u folikularnoj tečnosti (μIU/ml)	Da		1,52	,94	1,45	,19	4,17	t=-0,100 p=0,921
	Ne		1,54	,76	1,58	,25	3,17	
	Ukupno		1,53	,85	1,54	,19	4,17	
fT <sub>4u</sub> u folikularnoj tečnosti (pmol/l)	Da		16,28	2,36	16,42	11,01	20,19	t=1,006 p=0,319
	Ne		15,70	1,73	15,65	12,46	19,43	
	Ukupno		15,99	2,07	16,17	11,01	20,19	

Na osnovu analize dobijenih podataka utvrđeno je da nema značajnih razlika između grupa, kako kliničkih, tako i statističkih.

#### Tiroidna autoantitela u folikularnoj tečnosti

Deskriptivna statistika anti TPO At kao i anti Tg At u folikularnoj tečnosti prikazana je u tabeli 29.

*Tabela 29. Anti TPO At i anti Tg At u folikularnoj tečnosti*

Tiroidna autoimunost		Aritmetička					Rezultati testiranja
		sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum	
Anti TPO At u	Da	70,87	110,59	27,73	4,00	525,20	Z=-3,785
folikularnoj tečnosti (IU/ml)	Ne	7,97	16,76	4,00	4,00	89,80	p<0,001
	Ukupno	39,42	84,50	4,00	4,00	525,20	
Anti Tg At u	Da	180,98	356,45	38,29	9,00	1488,00	Z=-5,446
folikularnoj tečnosti (IU/ml)	Ne	10,74	2,59	9,00	9,00	18,35	p<0,001
	Ukupno	95,86	263,96	14,41	9,00	1488,00	

Kao i u slučaju serumskih antitela i ovde je evidentna razlika između grupa. Naime, medijana vrednosti koncentracije antitela daleko je veća u grupi pacijentkinja sa TAI nego u grupi pacijentkinja bez TAI i to: anti TPO At med= 27,73 (4,00-525,20 IU/ml) vs. 4,00 (4,00-89,80 IU/ml), anti Tg At med=38,29 (9,00-1488,00 IU/ml) vs. 9,00 (9,00-18,35 IU/ml) i ove razlike su statistički značajne ( $p<0,001$ ).

#### Progesteron u folikularnoj tečnosti

Deskriptivna statistika progesterona u folikularnoj tečnosti po ispitivanim grupama je prikazana u tabeli 30.

*Tabela 30. Progesteron u folikularnoj tečnosti*

Tiroidna autoimunost	Aritmetička				
	sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum
Da	21724,2	12157,3	21515	1500	46950
Ne	20676,6	11764,9	18865	942	47340
Ukupno	21200,4	11856,7	20225	942	47340

Prosečna vrednost progesterona u folikularnoj tečnosti je vrlo slična u obe ispitivane grupe. Statističkom analizom nije dobijena značajna razlika između ispitivanih grupa ( $t=0,316$ ;  $p=0,754$ ).

### Jajne ćelije

Deskriptivna statistika broja sakupljenih jajnih ćelija tj. oocita, broja kvalitetnih jajnih ćelija, kao i procenta kvalitetnih jajnih ćelija po ispitivanim grupama je prikazana u tabeli 31.

*Tabela 31. Jajne ćelije (broj, kvalitetne) i procenat kvalitetnih jajnih ćelija*

	Tiroidna autoimunost	Aritmetička sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum	
Broj jajnih ćelija	Da	9,65	4,66	9,00	3	21	Z=-0,717
	Ne	8,42	4,29	8,00	1	17	p=0,474
	Ukupno	9,04	4,48	8,50	1	21	
Broj kvalitetnih jajnih ćelija	Da	6,62	3,42	6,00	2	14	Z=-0,166
	Ne	6,19	3,43	6,00	0	14	p=0,869
	Ukupno	6,40	3,39	6,00	0	14	
Procenat kvalitetnih jajnih ćelija	Da	69,35	15,46	72,08	38	100	t=-0,323
	Ne	70,99	20,75	75,00	0	100	p=0,748
	Ukupno	70,17	18,14	75,00	0	100	

Kao što se vidi iz tabele prosečne vrednosti ispitivanih parametara su vrlo slične u obe ispitivane grupe. Statističkom analizom je utvrđeno da nema značajnih razlika između ispitivanih grupa.

### Stopa fertilizacije

U tabeli 32 prikazana je deskriptivna statistika stope fertilizacije po ispitivanim grupama.

*Tabela 32. Stopa fertilizacije*

Tiroidna autoimunost	Aritmetička sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum
Da	69,57	24,54	71,43	0	100
Ne	66,61	26,25	71,43	0	100
Ukupno	68,08	25,21	71,43	0	100

Kao što se vidi u tabeli, prosečna vrednost stope fertilizacije u procentima je vrlo slična u obe grupe, dok je medijana identična. Statističkom analizom je utvrđeno da nema značajne razlike između ispitivanih grupa ( $t=0,420$ ;  $p=0,676$ ).

### Embrioni

Deskriptivna statistika ukupnog broja embriona, kao i broja *top quality* embriona je prikazana u tabeli 33.

*Tabela 33. Ukupan broj embriona i broj top quality embriona*

	Tiroidna autoimunost	Aritmetička						Rezultati testiranja
		N	sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum	
Ukupan broj embriona	Da	26	5,15	3,12	5,0	0	12	Z=-0,812 p=0,417
	Ne	26	4,46	2,83	4,0	0	12	
	Ukupno	52	4,81	2,96	4,0	0	12	
Broj <i>top quality</i> embriona	Da	24	4,63	2,34	4,0	0	8	Z=-0,935 p=0,350
	Ne	24	4,13	2,27	3,5	1	11	
	Ukupno	48	4,37	2,29	4,0	0	11	

Kao i kada je u pitanju broj jajnih ćelija ne postoji statistički značajna razlika u prosečnom broju embriona između ispitivanih grupa. Naime, broj embriona je u obe analize nešto veći u grupi pacijentkinja sa TAI, ali je ova razlika klinički mala i nije statistički značajna.

### Embriotransfer

Distribucija pacijentkinja po ispitivanim grupama u odnosu na ET je prikazana u tabeli 34.

*Tabela 34. Embriotransfer*

		Embriotransfer			
		Ne	Da	Ukupno	
Tiroidna autoimunost	Da	N	3	23	26
		%	11,5%	88,5%	100,0%
	Ne	N	2	24	26
		%	7,7%	92,3%	100,0%
Ukupno	N	5	47	52	
	%	9,6%	90,4%	100,0%	

Iz tabele se jasno vidi da su procenti gotovo identični u obe ispitivane grupe. Statističkom analizom je utvrđeno da nema značajne razlike između ispitivanih grupa ( $X^2=0,221$ ;  $p=1,000$ ).

#### Broj transferisanih embriona

U tabeli 35 prikazana je deskriptivna statistika broja transferisanih embriona po ispitivanim grupama.

*Tabela 35. Broj transferisanih embriona*

Tiroidna autoimunost	Aritmetička					
	N	sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum
Da	23	2,35	,57	2	1	3
Ne	24	2,25	,53	2	1	3
Ukupno	47	2,30	,55	2	1	3

Kao i u nekoliko prethodnih analiza, razlika između grupa je gotovo zanemarljiva. Statističkom analizom je utvrđeno da nema značajne razlike između ispitivanih grupa ( $Z=-0,649$ ;  $p=0,516$ ).

#### Dan embriotransfera

Distribucija pacijentkinja u odnosu na dan kada je rađen ET (2. ili 3.dan od aspiracije jajnih ćelija) je prikazana u tabeli 36.

*Tabela 36. Dan embriotransfera*

		Dan ET			
			2	3	Ukupno
Tiroidna autoimunost	Da	N	17	6	23
		%	73,9%	26,1%	100,0%
	Ne	N	18	6	24
		%	75,0%	25,0%	100,0%
Ukupno	N	35	12	47	
	%	74,5%	25,5%	100,0%	

Kao i u prethodnoj analizi i ovde je distribucija pacijentkinja gotovo identična u obe ispitivane grupe. Statističkom analizom je utvrđeno da nema značajne razlike između ispitivanih grupa ( $X^2=0,007$ ;  $p=0,932$ ).

#### Stopa implantacije

Distribucija pacijentkinja prema stopi implantacije je prikazana u tabeli 37.

*Tabela 37. Stopa implantacije*

Tiroidna autoimunost	Aritmetička					
	N	sredina	SD	Median	Minimum	Maksimum
Da	23	21,01	32,65	,00	0	100
Ne	24	31,94	24,53	41,67	0	67
Ukupno	47	26,60	29,00	33,33	0	100

Iako postoji razlika u prosečnim vrednostima i medijanama, varijabilitet je jako veliki pa nema značajnosti razlike ( $Z=-1.686$ ;  $p=0,092$ ).

#### Broj biohemijskih i kliničkih trudnoća

Analizom podataka utvrđeno je da je broj biohemijskih i kliničkih trudnoća isti. Zapravo, sve pacijentkinje koje su imale biohemijsku trudnoću, postigle su i kliničku trudnoću. Iz tog razloga je u daljim analizama biohemijska i klinička trudnoća izjednačene su kao trudnoća uopšte.

## Trudnoća

Razlika između ispitivanih grupa po procentu trudnoća, bilo da se radi po započetom ciklusu, bilo da se radi po ET, prikazana je u tabeli 38.

Obzirom da pacijentkinje koje nisu imale ET nisu ni mogle da imaju biohemijsku, odnosno kliničku trudnoću, trudnoća je računata na dva načina. Prvi je po započetom ciklusu, što znači da su sve žene uzete u obzir i žene koje nisu imale ET uzete su kao negativne. Drugi način je po ET i u tom slučaju izuzete su žene koje nisu imale ET.

*Tabela 38. Trudnoća*

		Tiroidna autoimunost				Rezultati testiranja
		Da		Ne		
		N	%	N	%	
Trudnoća (po ET)	Ne	15	65,2%	8	33,3%	$X^2=4,778$ $p=0,029$
	Da	8	34,8%	16	66,7%	
Trudnoća (po započetom ciklusu)	Ne	18	69,2%	10	38,5%	$X^2=4,952$ $p=0,026$
	Da	8	30,8%	16	61,5%	

Iz tabele se jasno vidi da je procenat trudnoća daleko veći u grupi pacijentkinja koje nemaju TAI, bilo da se radi o trudnoći koja je računata po započetom ciklusu (61,5 vs. 30,8%,  $p=0,026$ ), bilo da se radi o trudnoći koja je računata po embriotransferu (66,7 vs. 34,8%,  $p=0,029$ ).

## Karakteristike trudnoće

U tabeli 39 prikazana je distribucija pacijentkinja po ispitivanim grupama u odnosu na gemelarnu trudnoću i rani spontani pobačaj.

*Tabela 39. Karakteristike trudnoće*

		Tiroidna autoimunost				Rezultati testiranja
		Da		Ne		
		N	%	N	%	
Gemelarna trudnoća	Ne	6	75.0%	8	50.0%	p=0,388
	Da	2	25.0%	8	50.0%	
Rani spontani pobačaj	Ne	8	100.0%	14	87.5%	p=0,536
	Da	0	0.0%	2	12.5%	

Kao što se vidi iz tabele, jedina evidentna klinički značajna razlika je kada je u pitanju gemelarna trudnoća. Naime, u grupi pacijentkinja koje imaju TAI evidentan je manji procenat gemelarnih trudnoća. Ipak, razlike između ispitivanih grupa nisu statistički značajne.

#### Korelacija serumskih parametara i parametara folikularne tečnosti sa parametrima vantelesne oplodnje

U tabeli 40 prikazana je korelaciona analiza serumskih parametara sa parametrima vantelesne oplodnje (broj jajnih ćelija i embriona, stopa fertilizacije i implantacije)



*Tabela 40. Korelaciona analiza serumskih parametara sa parametrima vantelesne oplodnje*

		TSH u serumu (μIU/ml)	fT <sub>4</sub> u serumu (pmol/l)	fT <sub>3</sub> u serumu (pmol/l)	Anti TPO u serumu (IU/ml)	Anti Tg At u serumu (IU/ml)
Broj jajnih ćelija	Koef.	-,103	-,106	-,196	,032	,311
	p vrednost	,469	,453	,164	,820	,025
Broj kvalitetnih jajnih ćelija	Koef.	-,134	-,138	-,238	,058	,235
	p vrednost	,342	,328	,090	,684	,093
Procenat kvalitetnih jajnih ćelija	Koef.	,016	-,058	-,165	,119	-,105
	p vrednost	,909	,681	,243	,400	,459
Stopa fertilizacije (%)	Koef.	-,030	,067	-,106	,053	-,085
	p vrednost	,834	,639	,457	,707	,550
Ukupan broj embriona	Koef.	-,139	-,122	-,281	,135	,284
	p vrednost	,325	,389	,044	,340	,041
Broj <i>top quality</i> embriona	Koef.	-,080	-,149	-,190	,125	,285
	p vrednost	,587	,312	,195	,397	,049
Broj transferisanih embriona	Koef.	-,032	,006	-,048	,200	,133
	p vrednost	,833	,970	,746	,177	,374
Stopa implantacije (%)	Koef.	,077	-,289	,197	-,252	-,006
	p vrednost	,609	,049	,184	,088	,969

Iz tabele se vidi da su korelacioni koeficijenti niski i da je jedina statistički značajna korelacija između ukupnog broja embriona i serumskog fT<sub>3</sub> i to u negativnom smeru (veća vrednost serumskog fT<sub>3</sub> prati niži broj ukupnog broja embriona i obrnuto), p=0,044. Broj kvalitetnih jajnih ćelija ima sličan koeficijent, ali bez statističke značajnosti. Zapaža se negativna korelacija fT<sub>4</sub> u serumu sa stopom implantacije (p=0,049). Ostali koeficijenti su daleko manji i nisu statistički značajni. Kada su u pitanju antitela, postoji statistički značajna korelacija serumskih anti Tg At sa brojem jajnih ćelija (p=0,025), ukupnim brojem embriona (p=0,041) i brojem visoko kvalitetnih

embriona ( $p=0,049$ ). Korelacija je pozitivnog smera, što znači da je variranje u istom smislu (porast vrednosti jednog parametra prati porast vrednosti drugog i obratno).

U tabeli 41 prikazana je korelaciona analiza folikularnih parametara sa parametrima vantelesne oplodnje (broj jajnih ćelija i embriona, stopa fertilizacije i implantacije)

*Tabela 41. Korelaciona analiza parametara folikularne tečnosti sa parametrima vantelesne oplodnje*

		TSH u folikularnoj tečnosti ( $\mu$ IU/ml)	fT <sub>4</sub> u folikularnoj tečnosti (pmol/l)	Anti TPO At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	Anti Tg u folikularnoj tečnosti At (IU/ml)	Progesteron u folikularnoj tečnosti (ng/ml)
Broj jajnih ćelija	Koef.	,194	-,021	,035	,338	-,017
	p vrednost	,169	,883	,806	,014	,902
Broj kvalitetnih jajnih ćelija	Koef.	,170	,030	,058	,266	,033
	p vrednost	,228	,830	,683	,057	,814
Procenat kvalitetnih jajnih ćelija	Koef.	,062	,194	,075	-,110	,182
	p vrednost	,665	,168	,596	,436	,196
Stopa fertilizacije (%)	Koef.	-,084	,006	-,060	-,035	-,021
	p vrednost	,553	,966	,672	,808	,881
Ukupan broj embriona	Koef.	,154	-,005	,047	,332	,003
	p vrednost	,276	,974	,738	,016	,985
Broj <i>top quality</i> embriona	Koef.	,172	-,038	-,019	,306	,047
	p vrednost	,242	,796	,897	,035	,749
Broj transferisanih embriona	Koef.	,096	-,051	,058	,116	,078
	p vrednost	,523	,732	,700	,439	,601
Stopa implantacije (%)	Koef.	,188	-,057	-,093	-,009	,253
	p vrednost	,206	,702	,533	,952	,086

Korelacija TSH i fT<sub>4</sub> u folikularnoj tečnosti sa ishodima je mala do zanemarljiva u većini slučajeva i nije statistički značajna. Ali korelacije anti TgAt u folikularnoj

tečnosti su značajne sa brojem jajnih ćelija ( $p=0,014$ ), brojem embriona ( $p=0,016$ ), brojem *top quality* embriona ( $p=0,035$ ) i na granici statističke značajnosti sa brojem kvalitetnih jajnih ćelija ( $p=0,057$ ). Korelacije su pozitivnog smera i solidne jačine.

Povezanost serumskih i parametara folikularne tečnosti u odnosu na ishod (trudnoća po ET)

Povezanost serumskih i analiza folikularne tečnosti u odnosu na ishod (trudnoća po ET) je prikazana u tabeli 42.

Tabela 42. Serumske i analize folikularne tečnosti u odnosu na ishod (trudnoća po ET)

		Trudnoća (po ET)					Rezultati testiranja
		Aritmetička sredina	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
TSH u serumu (μIU/ml)	Ne	1,9	,9	1,8	1,0	2,7	t=0,623
	Da	2,0	,8	2,0	1,4	2,4	p=0,536
fT <sub>4</sub> u serumu (pmol/l)	Ne	19,9	3,2	19,4	17,7	21,5	t=-2,490
	Da	17,7	2,8	17,6	16,3	19,6	p=0,017
fT <sub>3</sub> u serumu (pmol/l)	Ne	5,0	,6	4,9	4,8	5,6	t=1,600
	Da	5,3	,6	5,3	4,8	5,7	p=0,117
Anti TPO At u serumu (IU/ml)	Ne	75,8	122,4	23,6	11,0	102,8	Z=-1,724
	Da	56,1	127,6	12,1	9,6	22,0	p=0,085
Anti Tg At u serumu (IU/ml)	Ne	138,8	305,4	15,7	9,0	204,2	Z=-0,219
	Da	217,0	606,4	13,1	9,0	47,6	p=0,827
TSH u folikularnoj tečnosti (μIU/ml)	Ne	1,5	,9	1,6	,6	2,0	t=0,894
	Da	1,7	,8	1,7	1,0	2,2	p=0,376
fT <sub>4</sub> u folikularnoj tečnosti (pmol/l)	Ne	16,2	2,0	16,3	14,6	17,6	t=-0,727
	Da	15,8	2,3	15,8	14,6	17,3	p=0,471
Anti TPO At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	Ne	36,0	55,6	5,4	4,0	35,0	Z=-0,923
	Da	39,1	108,1	4,0	4,0	8,0	p=0,356
Anti Tg At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	Ne	68,1	92,7	14,0	9,0	125,1	Z=-0,409
	Da	137,9	377,4	14,0	9,0	28,0	p=0,683
Progesteron u folikularnoj tečnosti (ng/ml)	Ne	17931,7	10995,3	17550,0	9760,0	26210,0	t=1,926
	Da	24316,3	11698,1	25510,0	16275,0	29550,0	p=0,060

Iz tabele se vidi da postoji značajna razlika između trudnoće računate po ET kada je u pitanju serumski fT<sub>4</sub> (p=0,017) i to u smislu više vrednosti u grupi u kojoj nije ostvarena trudnoća, dok je razlika u vrednosti progesterona u folikularnoj tečnosti blizu konvencionalnog nivoa značajnosti (p=0,060) viša u grupi u kojoj je ostvarena trudnoća.

### Etiologija infertiliteta i trudnoća kao ishod

U tabeli 43 i 44 prikazana je etiologija infertiliteta i trudnoća po ET ili započetom ciklusu.

*Tabela 43. Etiologija infertiliteta i trudnoća po embriotransferu*

		Trudnoća po ET			
		Ne	Da	Ukupno	
Etiologija	Muški	N	8	9	17
		%	47.1%	52.9%	100.0%
	Ženski	N	7	3	10
		%	70.0%	30.0%	100.0%
	Mešoviti	N	3	4	7
		%	42.9%	57.1%	100.0%
	Nepoznatog uzroka	N	5	8	13
		%	38.5%	61.5%	100.0%
Ukupno		N	23	24	47
		%	48.9%	51.1%	100.0%

*Tabela 44. Etiologija infertiliteta i trudnoća po započetom ciklusu*

		Trudnoća po započetom ciklusu			
		Ne	Da	Ukupno	
Etiologija	Muški	N	13	9	22
		%	59.1%	40.9%	100.0%
	Ženski	N	7	3	10
		%	70.0%	30.0%	100.0%
	Mešoviti	N	3	4	7
		%	42.9%	57.1%	100.0%
	Nepoznatog uzroka	N	5	8	13
		%	38.5%	61.5%	100.0%
Ukupno		N	28	24	52
		%	53.8%	46.2%	100.0%

Različite etiologije infertiliteta nisu imali statistički značajan uticaj na ishod VTO (trudnoća po ET  $p=0.500$ ; trudnoća po započetom ciklusu  $p=0.437$ ).

#### Odnos TSH, $fT_4$ , antitela u serumu i folikularnoj tečnosti

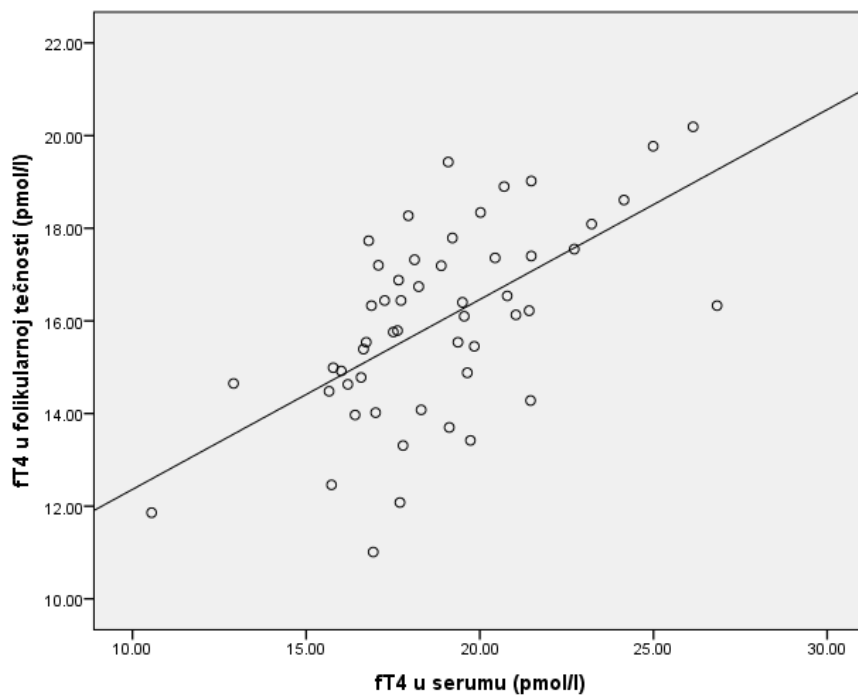
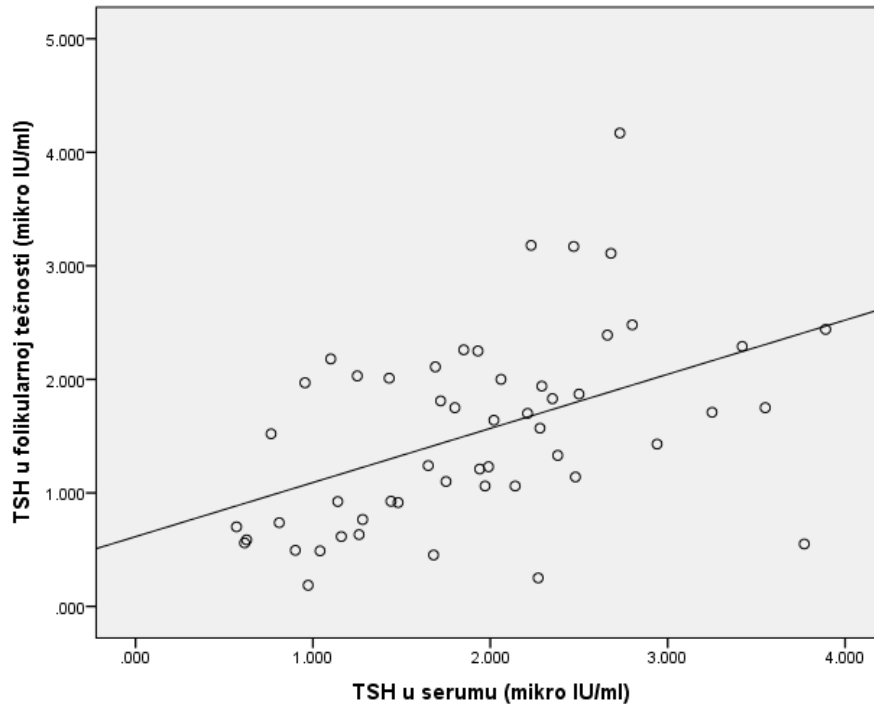
U tabeli 45 prikazana je korelacija serumskih i parametara folikularne tečnosti.

*Tabela 45. Korelacija serumskih i parametara folikularne tečnosti*

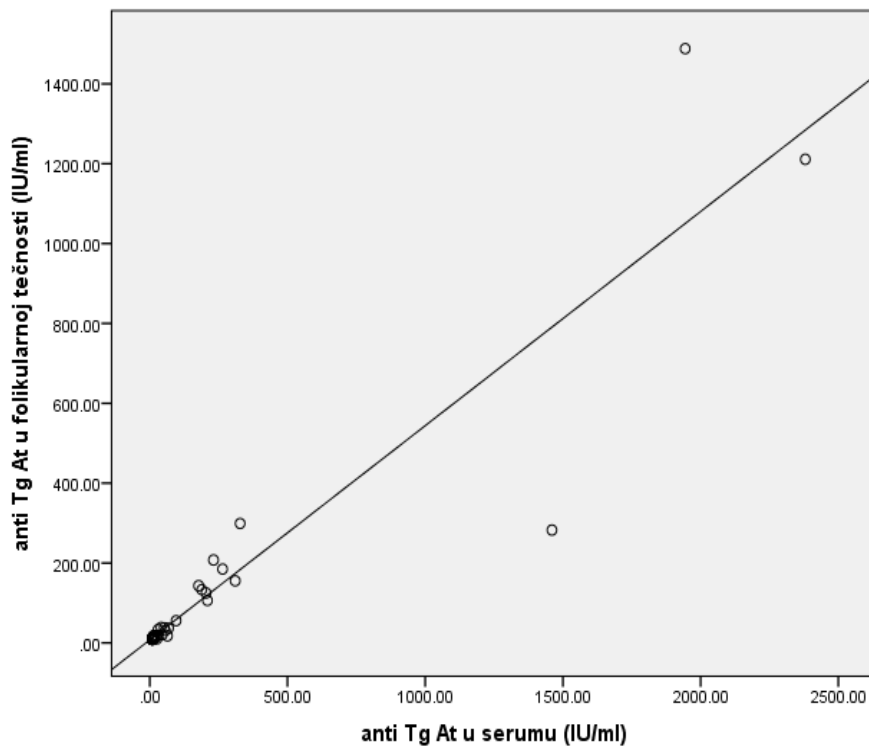
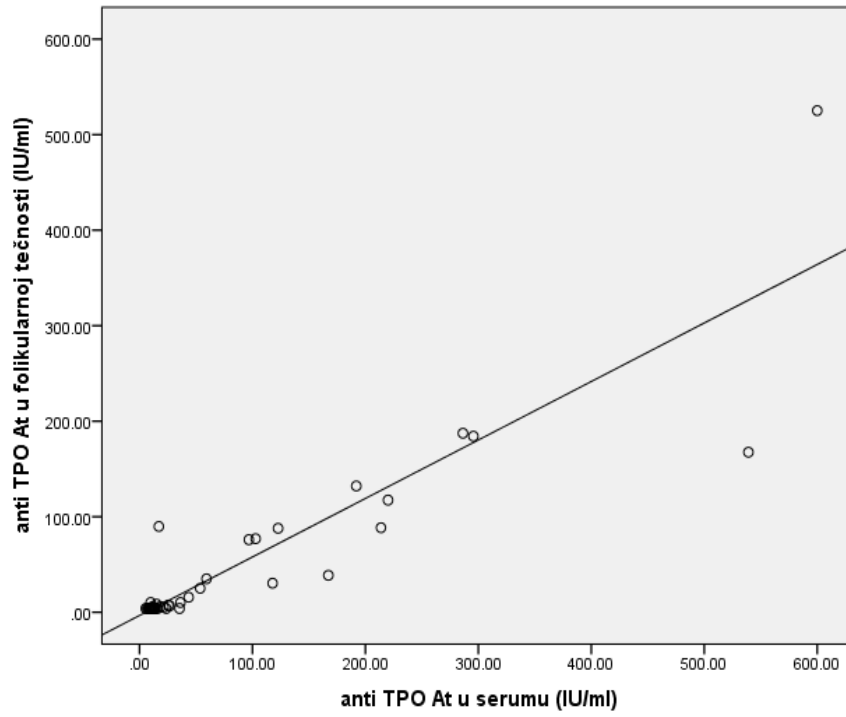
	Korelacija (p vrednost)
TSH	0,467 (<0,001)
$fT_4$	0,598 (<0,001)
Anti TPO At	0,903 (<0,001)
Anti Tg At	0,930 ( $p<0,001$ )

Kao što se vidi iz tabele, slaganje, odnosno korelacija je vrlo visoka. Zbog velikog varijabiliteta antitela, isti su testirani kao izvorni podaci, a zatim potvrđeni na podacima dobijenim logaritmovanjem. Obzirom da su rezultati vrlo slični, prikazani su samo izvorni podaci.

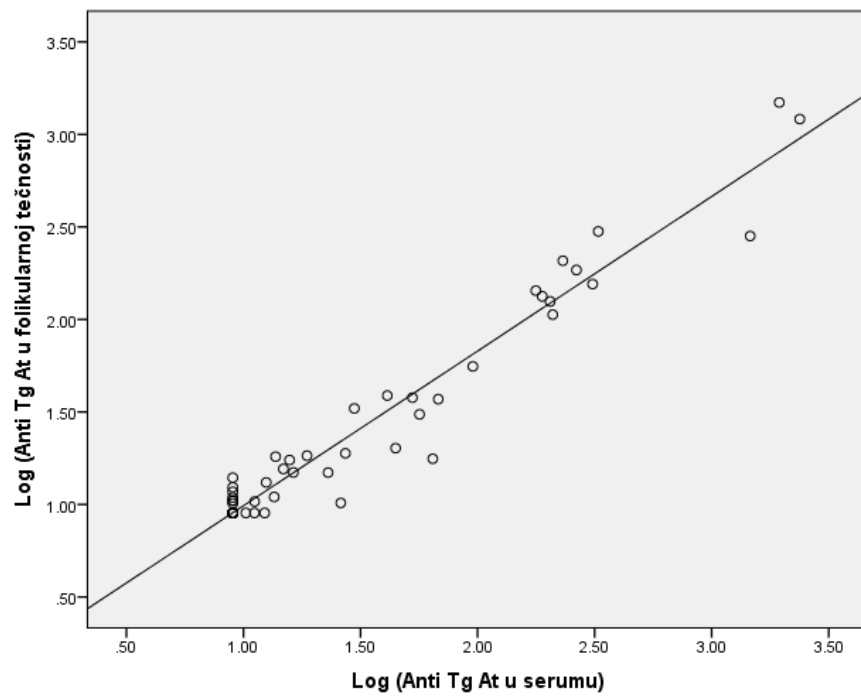
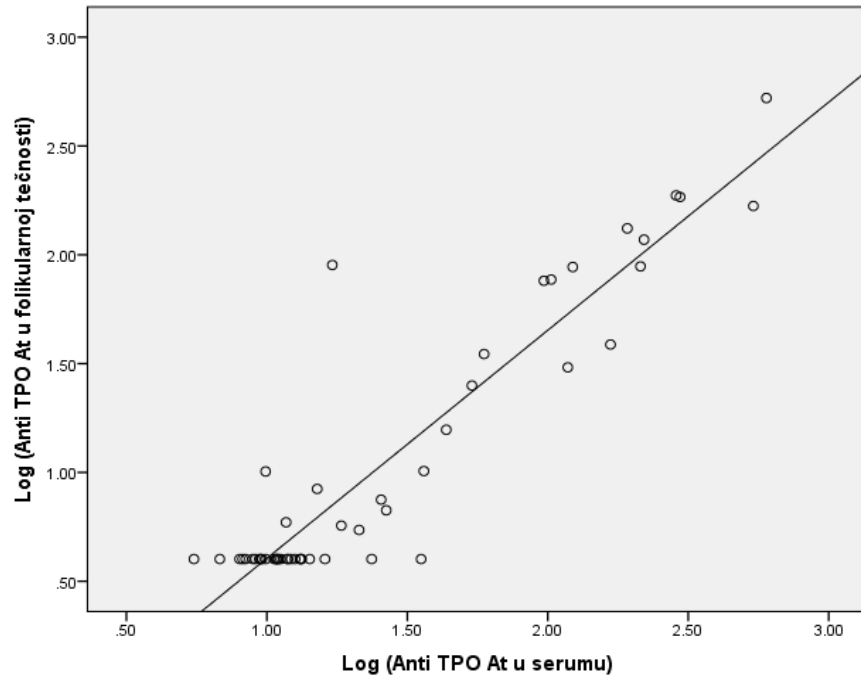
Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 1 i Grafikon 2).



*Grafikon 1. Korelacija serumskog i TSH i fT<sub>4</sub> u folikularnoj tečnosti*







Grafikon 2. Korelacija serumskih i anti TPO At i anti Tg At u folikularnoj tečnosti

Tabela 46 prikazuje korelaciju tiroidnih autoantitela u serumu i folikularnoj tečnosti po ispitivanim grupama

*Tabela 46. Korelacija tiroidnih autoantitela u serumu i folikularnoj tečnosti po ispitivanim grupama*

	TAI da (korelacija (p))	TAI ne (korelacija (p))
Anti TPO At	0,961 (<0,001)	0,438 (0,025)
Anti Tg At	0,945 (<0,001)	0,554 (0,003)

Korelacija progesterona u folikularnoj tečnosti sa tiroidnim autoantitelima u serumu i folikularnoj tečnosti

Korelaciona analiza progesterona u folikularnoj tečnosti sa anti TPO At i anti Tg At u serumu i folikularnoj tečnosti prikazana je u tabeli 47.

*Tabela 47. Korelaciona analiza progesterona u folikularnoj tečnosti sa anti TPO At i anti Tg At u serumu i folikularnoj tečnosti*

	Progesteron u folikularnoj tečnosti (ng/ml)	
	Rho	p vrednost
Anti TPO At u serumu (IU/ml)	-,222	,113
Anti Tg At u serumu (IU/ml)	,029	,837
Anti TPO At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	-,065	,649
Anti Tg At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	,109	,443

Kao što se vidi iz tabele, korelacija je mala, gotovo zanemarljiva i nije statistički značajna.

Korelaciona analiza progesterona u folikularnoj tečnosti sa anti TPO At i anti Tg At u serumu i folikularnoj tečnosti prikazana je po grupama u tabeli 48.

Tabela 48. Korelaciona analiza progesterona u folikularnoj tečnosti sa anti TPO At i anti Tg At u serumu i folikularnoj tečnosti po grupama

		Tiroidna autoimunost	Progesteron u folikularnoj tečnosti (ng/ml)	
			Rho	p vrednost
Da	Anti TPO At u serumu (IU/ml)		-,327	,103
	Anti Tg At u serumu (IU/ml)		,069	,739
	Anti TPO At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)		-,153	,456
	Anti Tg At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)		,202	,322
Ne	Anti TPO At u serumu (IU/ml)		-,184	,367
	Anti Tg At u serumu (IU/ml)		-,110	,593
	Anti TPO At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)		-,160	,436
	Anti Tg At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)		-,084	,682

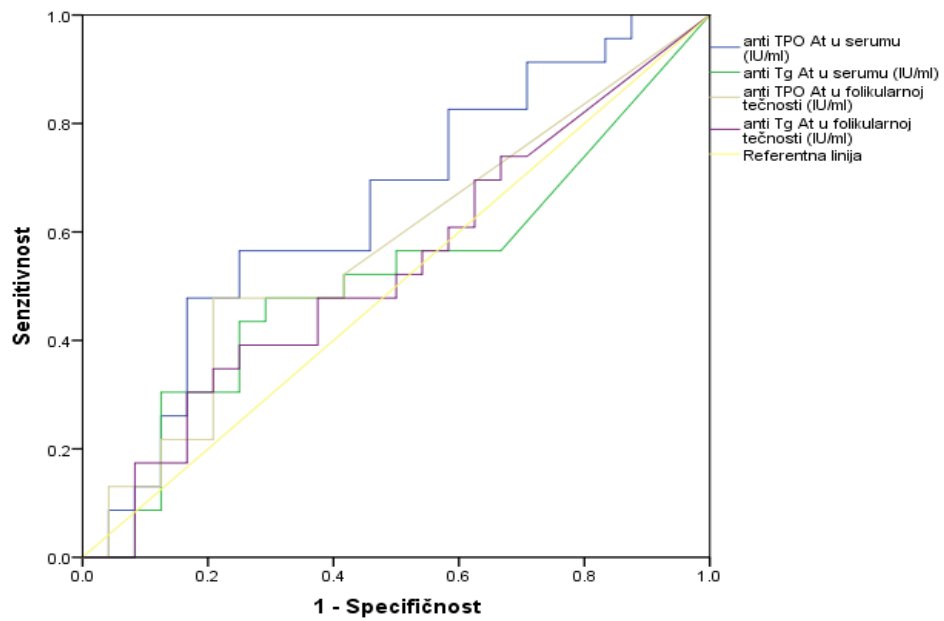
Vrednosti tiroidnih autoantitela u serumu i folikularnoj tečnosti za prognozu ishoda VTO

Da bi se odredio mogući *cut-off* za nivo antitela u serumu i folikularnoj tečnosti urađena je ROC analiza. Pod pretpostavkom da se tokom perioda u kojem je rađena VTO koncentracija ovih antitela neće menjati ispitivana je moguća *cut-off* vrednost, odnosno da li koncentracija antitela može služiti kao prediktivni marker za ishod (trudnoća po ET).

Tabela 49. Površina ispod krive

Testirani marker	Površina	p vrednost	95% IP za površinu	
Anti TPO At u serumu (IU/ml)	,647	,085	,487	,806
Anti Tg At u serumu (IU/ml)	,518	,831	,348	,688
Anti TPO At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	,572	,395	,406	,739
Anti Tg At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	,534	,686	,367	,702

Kao što se iz priloženog vidi, sve površine su malo udaljene od 0,5. Jedino je vrednost serumskih anti TPO antitela mogući prediktor ishoda, p vrednost je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti, ali nije značajan. Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 3).



Grafikon 3. ROC analiza antitela kao potencijalnih markera pozitivnog ishoda VTO

I iz grafikona se vidi da jedino serumska anti TPO At imaju nešto veću površinu od ostalih markera. Obzirom da nema statističke značajnosti, *cut-off* vrednost nije izračunavana.

#### Korelacija vremena postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti do ispitivanja sa trajanjem infertiliteta i vrednostima tiroidnih autoantitelima

Korelaciona analiza vremena postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti do ispitivanja sa trajanjem infertiliteta i vrednostima tiroidnih autoantitelima i progesterona je prikazana u tabeli 50.

*Tabela 50. Korelaciona analiza vremena postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje sa trajanjem infertiliteta i vrednostima tiroidnih autoantitela i progesterona*

		Vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje (meseci)	Vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje (meseci) bez novootkrivenih pacijentkinja
Trajanje infertiliteta	Rho	-,013	,222
	p vrednost	,948	,348
Anti TPO At u serumu (IU/ml)	Rho	,445	,246
	p vrednost	,023	,296
Anti Tg At u serumu (IU/ml)	Rho	,129	,090
	p vrednost	,530	,704
Anti Tg At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	Rho	,114	,179
	p vrednost	,579	,451
Anti TPO At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	Rho	,403	,216
	p vrednost	,041	,361
Progesteron u folikularnoj tečnosti (ng/ml)	Rho	-,361	-,133
	p vrednost	,070	,577

Na osnovu rezultata korelacione analize, utvrđeno je da postoji statistički značajna korelacija između vremenskog perioda od postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti do ispitivanja sa anti TPO At u serumu ( $p=0,023$ ) i folikularnoj tečnosti ( $p=0,041$ ), kada se uzmu u obzir svi pacijenti (uključujući i novodijagnostikovane pacijentkinje). Korelacija je pozitivnog smera i pozitivne jačine. Sa istim parametrom je blizu statističke značajnosti i progesteron u folikularnoj tečnosti ( $p=0,070$ ). Ovog puta korelacija je negativnog smera.

Korelaciona analiza vremena postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje sa parametrima vantelesne oplodnje (broj i kvalitet jajnih ćelija i embriona, stopa fertilizacije i implantacije)

Sledeća tabela (Tabela 51) prikazuje korelaciju vremena postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje sa parametrima vantelesne oplodnje (broj i kvalitet jajnih ćelija i embriona, stopa fertilizacije i implantacije)

*Tabela 51. Vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje i parametri vantelesne oplodnje*

		Vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje (meseci)	Vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje (meseci) bez novootkrivenih pacijentkinja
Broj jajnih ćelija	Rho	,292	,356
	p vrednost	,148	,123
Broj kvalitetnih jajnih ćelija	Rho	,257	,270
	p vrednost	,205	,250
Procenat kvalitetnih jajnih ćelija	Rho	-,050	-,108
	p vrednost	,807	,651
Stopa fertilizacije (%)	Rho	,017	-,169
	p vrednost	,936	,476
Ukupan broj embriona	Rho	,194	,166
	p vrednost	,343	,486
Broj <i>top quality</i> embriona	Rho	-,061	-,025
	p vrednost	,776	,919
Broj transferisanih embriona	Rho	,304	,288
	p vrednost	,158	,246
Stopa implantacije (%)	Rho	-,250	-,057
	p vrednost	,250	,824

Na osnovu rezultata korelacione analize utvrđeno je da nema značajnih korelacija dužine bolesti i navedenih parametara. Neke korelacije imaju nešto veći koeficijent korelacije (broj jajnih ćelija, broj kvalitetnih jajnih ćelija, broj transferisanih embriona), ali bez značajnosti.

Vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti do ispitivanja u odnosu na trudnoću, gemelarnu trudnoću i rani spontani pobačaj

Deskriptivna i analitička statistika vremena postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti do ispitivanja u odnosu na trudnoću, gemelarnu trudnoću i rani spontani pobačaj prikazana je u tabeli 52.

*Tabela 52. Vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti do ispitivanja u odnosu na trudnoću, gemelarnu trudnoću i rani spontani pobačaj*

		Vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje (meseći)						Rezultati testiranja
		Aritmetička						
		N	sredina	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
Trudnoća (po ET)	Ne	15	44,8	43,7	24,0	17,0	84,0	Z=-1,170 p=0,255
	Da	8	19,6	20,1	16,0	,0	38,5	
Gemelarna trudnoća	Ne	6	19,7	20,3	16,0	,0	38,0	-
	Da	2	19,5	27,6	19,5	,0	39,0	
Rani spontani pobačaj	Ne	8	19,6	20,1	16,0	,0	38,5	-
	Da	0	,	,	,	,	,	

Iz tabele se vidi da nema značajnih razlika. Ali evidentno je da je vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti do ispitivanja duže kod pacijentkinja koje nisu ostale trudne, kao i kod pacijentkinja koje nisu imale gemelarnu trudnoću.

Kada se uradi ista analiza, samo se isključe novootkrivene pacijentkinje, medijane su približne (tabela 53).

*Tabela 53. Vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje (bez novootkrivenih pacijentkinja) u odnosu na trudnoću, gemelarnu trudnoću i rani spontani pobačaj*

		Vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje (meseci) bez novootkrivenih pacijentkinja						Rezultati testiranja
		Aritmetička						
		N	sredina	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
Trudnoća (po ET)	Ne	13	51,7	43,0	36,0	22,0	84,0	Z=-0,346 p=0,756
	Da	5	31,4	15,6	38,0	24,0	39,0	
Gemelarna trudnoća	Ne	4	29,5	17,4	31,0	16,0	43,0	-
	Da	1	39,0	,	39,0	39,0	39,0	
Rani spontani pobačaj	Ne	5	31,4	15,6	38,0	24,0	39,0	-
	Da	0	,	,	,	,	,	

Korelaciona analiza trajanja terapije prema trajanju infertiliteta, tiroidnim autoantitelima i broju jajnih ćelija i embriona

Korelacija trajanja terapije (supstitucija levotiroksinom) prema trajanju infertiliteta, tiroidnim autoantitelima i broju jajnih ćelija i embriona je prikazana u tabeli 54.



*Tabela 54. Korelacija trajanja terapije prema trajanju infertiliteta, tiroidnim autoantitelima i broju i kvalitetu jajnih ćelija i embriona i stopama fertilizacije i implantacije*

	Trajanje terapije (meseci)	
	Rho	p vrednost
Trajanje infertiliteta	-,086	,717
anti TPO At u serumu (IU/ml)	,425	,062
anti Tg At u serumu (IU/ml)	-,158	,505
anti TPO At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	,350	,131
anti Tg At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	-,149	,532
Broj jajnih ćelija	-,039	,871
Broj kvalitetnih jajnih ćelija	-,129	,589
Procenat kvalitetnih jajnih ćelija	-,220	,352
Stopa fertilizacije (%)	-,014	,952
Ukupan broj embriona	-,171	,470
Broj <i>top quality</i> embriona	-,136	,579
Broj transferisanih embriona	,310	,210
Stopa implantacije (%)	,187	,458

Na osnovu rezultata korelacione analize utvrđeno je da je jedino korelacija trajanja terapije sa serumskim anti TPO antitelima blizu konvencionalnog nivoa značajnosti ( $p=0,062$ ) i solidne jačine ( $Rho=0,425$ ). Pored nje, interesantna je povezanost sa anti TPO antitelima u folikularnoj tečnosti ( $Rho=0,350$ ,  $p=0,131$ ), kao i sa brojem transferisanih embriona ( $Rho=0,310$ ,  $p=0,210$ ), ali ponovo, bez statističke značajnosti.

#### Korelaciona analiza trajanja terapije u odnosu na trudnoću, gemelarnu trudnoću i rane spontane pobačaje

U tabeli 55 prikazana je korelaciona analiza trajanja terapije u odnosu na trudnoću, gemelarnu trudnoću i rane spontane pobačaje

*Tabela 55. Trajanje terapije u odnosu na trudnoću, gemelarnu trudnoću i rane spontane pobačaje*

		Trajanje terapije (meseći)						Rezultati testiranja
		Aritmetička						
		N	sredina	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
Trudnoća (po ET)	Ne	13	36,5	44,4	17,0	12,0	36,0	Z=-0,692 p=0,517
	Da	5	28,6	14,0	36,0	24,0	38,0	
Gemelarna trudnoća	Ne	4	26,0	14,7	30,0	15,0	37,0	-
	Da	1	39,0	,	39,0	39,0	39,0	
Rani spontani pobačaj	Ne	5	28,6	14,0	36,0	24,0	38,0	-
	Da	0	,	,	,	,	,	

Na osnovu dobijenih rezultata je utvrđeno da je trajanje terapije kraće kod pacijentkinja koje nisu bile trudne.

Korelacija podataka Doppler sonografije tiroidne žlezde sa procenom vaskularizacije, sa hormonskim analizama

Korelacija podataka eho pregleda tiroidne žlezde sa hormonskim analizama je prikazana u tabeli 56.

*Tabela 56. Korelacija podataka eho pregleda tiroidne žlezde sa hormonskim analizama*

		Ehogenost struktura žlezde	Ehogenost tkiva	Prokrvljenost
TSH u serumu ( $\mu$ IU/ml)	Rho	,001	,421	,391
	p vrednost	,996	,032	,048
fT <sub>4</sub> u serumu (pmol/l)	Rho	-,036	-,198	-,065
	p vrednost	,860	,333	,754
fT <sub>3</sub> u serumu (pmol/l)	Rho	-,268	,151	,029
	p vrednost	,186	,462	,889
Anti TPO At u serumu (IU/ml)	Rho	,304	-,565	,180
	p vrednost	,131	,003	,380
Anti Tg At u serumu (IU/ml)	Rho	-,015	,199	-,018
	p vrednost	,943	,331	,931
TSH u folikularnoj tečnosti ( $\mu$ IU/ml)	Rho	-,161	,215	,110
	p vrednost	,433	,292	,592
fT <sub>4</sub> u folikularnoj tečnosti (pmol/l)	Rho	-,165	-,157	-,203
	p vrednost	,419	,444	,321
Anti TPO At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	Rho	,218	-,528	,125
	p vrednost	,285	,006	,543
Anti Tg At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	Rho	-,046	,170	-,053
	p vrednost	,825	,406	,797
Progesteron u folikularnoj tečnosti (ng/ml)	Rho	-,352	,349	-,079
	p vrednost	,078	,080	,703

Rezultati korelacione analize pokazuju da postoji značajna korelacija ehogenosti sa serumskim TSH (pozitivnog smera, solidna), serumskim anti TPO At (negativnog smera, jaka), anti TPO At u folikularnoj tečnosti (negativnog smera, jaka), dok je korelacija blizu konvencionalnog nivoa značajnosti kod progesterona u folikularnoj tečnosti. Prokrvljenost jedino korelira sa nivoom TSH u serumu ( $p=0,048$ ).

Protokol u odnosu na serumske i parametre folikularne tečnosti

U tabeli 57 prikazana je deskriptivna statistika serumskih i parametara folikularne tečnosti u odnosu na pacijente sa kratkim i dugim protokolom.

*Tabela 57. Serumski i parametri folikularne tečnosti u odnosu na protokol*

		Protokol					Rezultati testiranja
		Aritmetička sredina	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
TSH u serumu (μIU/ml)	kratki	2,1	,9	2,0	1,5	2,7	Z=-1,726
	dugi	1,6	,7	1,3	1,1	2,2	p=0,084
fT <sub>4</sub> u serumu (pmol/l)	kratki	19,2	2,6	19,1	17,1	20,7	t=1,189
	dugi	18,1	3,7	17,7	16,7	19,6	p=0,240
fT <sub>3</sub> u serumu (pmol/l)	kratki	5,3	,7	5,4	4,8	5,8	t=1,829
	dugi	5,0	,6	5,1	4,5	5,4	p=0,073
Anti TPO At u serumu (IU/ml)	kratki	69,4	121,0	15,1	10,8	59,3	Z=-0,302
	dugi	70,6	135,7	13,1	10,6	26,6	p=0,762
Anti Tg At u serumu (IU/ml)	kratki	118,8	402,4	11,2	9,0	52,7	Z=-1,450
	dugi	258,2	556,6	26,0	12,3	177,4	p=0,147
TSH u folikularnoj tečnosti (μIU/ml)	kratki	1,5	,8	1,4	,9	2,0	Z=-0,137
	dugi	1,6	1,0	1,8	,6	2,0	p=0,891
fT <sub>4</sub> u folikularnoj tečnosti (pmol/l)	kratki	16,3	2,0	16,4	14,8	17,6	t=1,325
	dugi	15,5	2,1	15,5	14,5	16,4	p=0,191
Anti TPO At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	kratki	45,3	97,6	4,0	4,0	35,0	Z=-0,276
	dugi	27,3	48,0	4,0	4,0	10,1	p=0,783
Anti Tg At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	kratki	73,1	208,7	11,7	9,0	33,1	Z=-1,688
	dugi	142,7	355,0	18,4	10,9	133,3	p=0,091
Progesteron u folikularnoj tečnosti (ng/ml)	kratki	22700,3	10701,0	21330,0	16100,0	27060,0	Z=-1,122
	dugi	18112,4	13773,5	16450,0	6660,0	27650,0	p=0,262

Na osnovu dobijenih rezultata je jasno da nema statistički značajnih razlika, ali postoje razlike u deskriptivnim parametrima, kada je u pitanju serumski TSH u smislu

viših prosečnih vrednosti kod kratkog protokola, kao i za serumski  $fT_3$ , dok serumska anti Tg At i anti Tg At u folikularnoj tečnosti su bila viših prosečnih vrednosti kod primenjenog dugog protokola.

Protokol u odnosu na broj jajnih ćelija i embriona, stopu fertilizacije i stopu implantacije

U tabeli 58 prikazana je deskriptivna i analitička statistika broja jajnih ćelija i embriona, stope fertilizacije i implantacije u odnosu na kratki i dugi protokol.

*Tabela 58. Broj jajnih ćelija i embriona, stopa fertilizacije i implantacije u odnosu na protokol*

		Protokol					Rezultati testiranja
		Aritmetička sredina	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
Broj jajnih ćelija	Kratki	8,2	4,8	8,0	5,0	10,0	Z=-2,556
	Dugi	10,8	3,1	10,0	8,0	13,0	p=0,011
Broj kvalitetnih jajnih ćelija	Kratki	5,8	3,4	5,0	3,0	7,0	Z=-2,127
	Dugi	7,7	3,1	7,0	6,0	9,0	p=0,033
Procenat kvalitetnih jajnih ćelija	Kratki	70,3	20,0	75,0	60,0	81,8	Z=-0,342
	Dugi	70,0	14,0	72,7	57,1	81,8	p=0,732
Stopa fertilizacije (%)	Kratki	65,7	27,2	71,4	53,9	80,0	Z=-0,745
	Dugi	72,9	20,3	75,0	60,0	85,7	p=0,457
Ukupan broj embriona	Kratki	4,1	2,7	4,0	2,0	6,0	Z=-2,174
	Dugi	6,2	3,0	6,0	4,0	7,0	p=0,030
Broj <i>top quality</i> embriona	Kratki	3,9	2,1	3,0	3,0	5,0	Z=-1,802
	Dugi	5,3	2,5	5,0	3,0	7,0	p=0,072
Broj transferisanih embriona	Kratki	2,4	,6	2,0	2,0	3,0	Z=-1,923
	Dugi	2,1	,3	2,0	2,0	2,0	p=0,054
Stopa implantacije (%)	Kratki	17,8	23,1	,0	,0	33,3	Z=-2,727
	Dugi	42,2	32,3	50,0	,0	50,0	p=0,006

Za razliku od prethodne analize, ovde postoje evidentne statistički značajne razlike između grupa. Značajna razlika je između grupa po broju jajnih ćelija kojih je prosečno više u grupi pacijentkinja u kojoj je primenjen dugi protokol ( $p=0.011$ ), kao i broj kvalitetnih jajnih ( $p=0.033$ ) i ukupan broj embriona ( $p=0.030$ ), dok je razlika na samoj granici konvencionalnog nivoa značajnosti, odnosno blizu kod broja transferisanih embriona sa ( $p=0.054$ ) i broja *top quality* embriona ( $p=0.072$ ). Stopa implantacije je bila veća nakon primene dugog protokola ( $p=0.006$ ).

#### Protokol u odnosu na ishod

Distribucija pacijentkinja prema tipu protokola u odnosu na ishod VTO je prikazana u tabeli 59.

*Tabela 59. Ishod vantelesne oplodnje*

		Protokol				Rezultati testiranja
		Kratki		Dugi		
		N	%	N	%	
Trudnoća (po ET)	Ne	18	60,0%	5	29,4%	$X^2=4,063$ $p=0,044$
	Da	12	40,0%	12	70,6%	
Gemelarna trudnoća	Ne	5	41,7%	9	75,0%	$p=0,214$
	Da	7	58,3%	3	25,0%	
Rani spontani pobačaj	Ne	10	83,3%	12	100,0%	$p=0,478$
	Da	2	16,7%	0	0,0%	

Pacijentkinje sa dugim protokolom imaju statistički značajno veći broj uspešnih VTO u odnosu na pacijentkinje na kratkom protokolu 70,6 vs. 40,0%,  $p=0,044$ . Razlike po gemelarnoj trudnoći i ranim spontanim pobačajima nisu značajne.

#### Korelacija broja dana stimulacije, ukupne količine gonadotropina i serumskog estradiola na dan završne injekcije sa serumskim i parametrima folikularne tečnosti

Korelaciona analiza broja dana stimulacije, ukupne količine gonadotropina i serumskog estradiola na dan završne injekcije sa serumskim i folikularnim parametrima je prikazana u tabeli 60.

*Tabela 60. Korelaciona analiza broja dana stimulacije, ukupne količine gonadotropina i serumskog estradiola sa serumskim i folikularnim parametrima*

		Broj dana stimulacije	Ukupna količina gonadotropina (IU)	Serumski estradiol na dan završne injekcije (pmol/l)
TSH u serumu ( $\mu$ IU/ml)	Koeficijent	-,132	,079	-,136
	p vrednost	,352	,577	,335
fT <sub>4</sub> u serumu (pmol/l)	Koeficijent	,243	,034	-,193
	p vrednost	,083	,813	,170
fT <sub>3</sub> u serumu (pmol/l)	Koeficijent	-,097	,155	-,222
	p vrednost	,494	,272	,114
Anti TPO At u serumu (IU/ml)	Koeficijent	,047	-,062	-,132
	p vrednost	,741	,661	,350
Anti Tg At u serumu (IU/ml)	Koeficijent	-,041	-,345	,184
	p vrednost	,774	,012	,192
TSH u folikularnoj tečnosti ( $\mu$ IU/ml)	Koeficijent	-,193	-,111	,268
	p vrednost	,170	,431	,054
fT <sub>4</sub> u folikularnoj tečnosti (pmol/l)	Koeficijent	-,117	,161	,012
	p vrednost	,409	,255	,931
Anti TPO At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	Koeficijent	-,046	,005	-,101
	p vrednost	,748	,973	,476
Anti Tg At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	Koeficijent	-,018	-,311	,219
	p vrednost	,897	,025	,118
Progesteron u folikularnoj tečnosti (ng/ml)	Koeficijent	-,163	,323	,173
	p vrednost	,249	,020	,220

Iz tabele se vidi da postoji značajna korelacija ukupne količine gonadotropina sa serumskim anti Tg At ( $p=0,012$ ), anti Tg At ( $p=0,025$ ) i progesteronom u folikularnoj tečnosti ( $p=0,020$ ), i to negativnog smera za antitela, a pozitivnog za progesteron. Na samoj granici statističke značajnosti je korelacija estradiola na dan završne injekcije i

TSH u folikularnoj tečnosti, pozitivnog smera. Ostale korelacije nisu statistički značajne.

Korelacija metoda vantelesne oplodnje sa serumskim i parametrima folikularne tečnosti

Korelaciona analiza metoda fertilizacije sa serumskim i folikularnim parametrima je prikazana u tabeli 61.



*Tabela 61. Korelaciona analiza metoda fertilizacije sa serumskim i folikularnim parametrima*

		Metod fertilizacije					p vrednost
		Aritmetička		Median	Minimum	Maximum	
		sredina	SD				
TSH u serumu ( $\mu$ IU/ml)	ICSI	1,87	,86	1,90	,57	3,77	t=-0,787
	IVF/ICSI	2,06	,76	2,08	1,10	3,89	p=0,435
fT <sub>4</sub> u serumu (pmol/l)	ICSI	19,40	2,91	19,17	15,66	26,83	t=2,017
	IVF/ICSI	17,63	2,96	17,67	10,55	22,72	p=0,049
fT <sub>3</sub> u serumu (pmol/l)	ICSI	5,21	,66	5,14	3,95	6,90	t=0,019
	IVF/ICSI	5,20	,69	5,31	3,87	6,26	p=0,985
Anti TPO At u serumu (IU/ml)	ICSI	83,43	145,32	12,85	5,50	600,00	Z=-0,089
	IVF/ICSI	39,05	45,46	16,75	6,80	167,20	p=0,929
Anti Tg At u serumu (IU/ml)	ICSI	144,45	455,07	12,92	9,00	2380,00	Z=-1,443
	IVF/ICSI	209,21	475,35	60,44	9,00	1944,00	p=0,149
TSH u folikularnoj tečnosti ( $\mu$ IU/ml)	ICSI	1,37	,86	1,22	,19	4,17	
	IVF/ICSI	1,90	,70	1,97	,63	3,18	t=-2,128 p=0,038
fT <sub>4</sub> u folikularnoj tečnosti (pmol/l)	ICSI	16,30	2,03	16,28	12,46	20,19	t=1,647
	IVF/ICSI	15,30	2,05	15,96	11,01	17,55	p=0,106
Anti TPO At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	ICSI	49,18	99,11	4,00	4,00	525,20	Z=-0,259
	IVF/ICSI	17,48	24,92	4,85	4,00	76,99	p=0,796
Anti Tg At u folikularnoj tečnosti (IU/ml)	ICSI	68,68	204,49	12,05	9,00	1211,00	Z=-1,786
	IVF/ICSI	157,04	365,46	24,18	9,00	1488,00	p=0,074
Progesteron u folikularnoj tečnosti (ng/ml)	ICSI	20551,44	11194,71	19190,00	942,00	45650,00	Z=-0,555
	IVF/ICSI	22660,63	13500,88	24350,00	1500,00	47340,00	p=0,579

Iz tabele se vidi da postoji značajna razlika samo kada je reč o vrednostima serumskom fT<sub>4</sub>, gde se zapažaju više prosečne vrednosti kod primene ICSI metoda (p=0,049) i povišenim prosečnim vrednostima TSH u folikularnoj tečnosti kod primene kombinovanog metoda (p=0,038). Razlike po ostalim parametrima nisu statistički značajne.

Korelacija broja dana stimulacije, ukupne količine gonadotropina i estradiola sa brojem jajnih ćelija i embriona

Korelaciona analiza broja dana stimulacije, ukupne količine gonadotropina i estradiola sa brojem jajnih ćelija i embriona, stopama fertilizacije i implantacije je prikazana u tabeli 62.

*Tabela 62. Korelaciona analiza broja dana stimulacije, ukupne količine gonadotropina i estradiola sa brojem jajnih ćelija i embriona, stopama fertilizacije i implantacije*

		Broj dana stimulacije	Ukupna količina gonadotropina (IJ)	Estradiol na dan završne injekcije(pmol/l)
Broj jajnih ćelija	Koeficijent	-,059	-,311	,568
	p vrednost	,678	,025	<,001
Broj kvalitetnih jajnih ćelija	Koeficijent	,044	-,197	,548
	p vrednost	,759	,162	<,001
Procenat kvalitetnih jajnih ćelija	Koeficijent	,132	,174	,069
	p vrednost	,352	,217	,628
Stopa fertilizacije (%)	Koeficijent	,418	,095	,089
	p vrednost	,002	,504	,528
Ukupan broj embriona	Koeficijent	,199	-,188	,498
	p vrednost	,156	,181	<,001
Broj <i>top quality</i> embriona	Koeficijent	,197	-,179	,316
	p vrednost	,180	,224	,029
Broj transferisanih embriona	Koeficijent	-,020	,055	,090
	p vrednost	,892	,713	,545
Stopa implantacije (%)	Koeficijent	-,263	-,140	,116
	P vrednost	,075	,349	,436

Iz tabele se vidi da postoji značajna korelacija broja dana stimulacije sa stopom fertilizacije pozitivnog smera ( $p=0,002$ ), količine gonadotropina sa brojem jajnih ćelija negativnog smera ( $p=0,025$ ), kao i pozitivna korelacija estradiola na dan završne injekcije sa brojem jajnih ćelija ( $p<0,001$ ), kvalitetnih jajnih ćelija ( $p<0,001$ ), ukupnim brojem embriona ( $p<0,001$ ) i brojem *top quality* embriona ( $p=0,029$ ).

Korelaciona analiza metoda fertilizacije sa brojem jajnih ćelija i embriona, stopama fertilizacije i implantacije

Korelaciona analiza metoda fertilizacije sa brojem jajnih ćelija i embriona, stopama fertilizacije i implantacije je prikazana u tabeli 63.

*Tabela 63. Korelaciona analiza metoda fertilizacije sa brojem jajnih ćelija i embriona, stopama fertilizacije i implantacije*

		Metod fertilizacije					Rezultati testiranja
		Aritmetička					
		sredina	SD	Median	Minimum	Maximum	
Broj jajnih ćelija	ICSI	7,53	3,79	7,50	1,00	17,00	t=-4,200
	IVF/ICSI	12,44	4,11	11,00	8,00	21,00	p<0,001
Broj kvalitetnih jajnih ćelija	ICSI	5,56	3,26	5,00	,00	14,00	t=-2,889
	IVF/ICSI	8,31	2,96	8,00	4,00	14,00	p=0,006
Procenat kvalitetnih jajnih ćelija	ICSI	71,46	20,16	75,00	,00	100,00	t=0,764
	IVF/ICSI	67,27	12,54	69,62	38,09	82,35	p=0,448
Stopa fertilizacije (%)	ICSI	69,86	28,90	75,00	,00	100,00	Z=-1,663
	IVF/ICSI	64,11	13,70	66,67	33,33	85,71	p=0,096
Ukupan broj embriona	ICSI	4,08	2,89	4,00	,00	12,00	t=-2,817
	IVF/ICSI	6,44	2,50	6,00	3,00	12,00	p=0,007
Broj <i>top quality</i> embriona	ICSI	3,72	2,08	3,00	,00	8,00	Z=-2,876
	IVF/ICSI	5,69	2,18	5,50	3,00	11,00	p=0,004
Broj transferisanih embriona	ICSI	2,32	,60	2,00	1,00	3,00	Z=-0,580
	IVF/ICSI	2,25	,45	2,00	2,00	3,00	p=0,562
Stopa implantacije (%)	ICSI	22,04	27,35	,00	0	100	Z=-1,632;
	IVF/ICSI	35,42	30,96	50,00	0	100	p=0,103

Iz tabele se vidi da se statistički značajne razlike nalaze po broju jajnih ćelija ( $p<0.001$ ), broju kvalitetnih jajnih ćelija ( $p=0.006$ ), ukupnom broju embriona ( $p=0.007$ ), broju *top quality* embriona ( $p=0.004$ ). Više prosečne vrednosti ovih parametara se zapažaju kod primene kombinacije IVF/ICSI metoda.

### Logistički regresioni modeli sa trudnoćom po ET kao ishodom

U tabelama 64. i 65. prikazane su uni- i multivarijantna analiza sa trudnoćom po ET kao ishodom.

*Tabela 64. Tiroidna autoimunost i trudnoća*

	p vrednost	OR	95% IP za OR	
TAI da	0,032	0,267	0,080	0,891

Šansa da dođe do trudnoće je 3,75 puta manja ukoliko pacijentkinja ima TAI. Objašnjeni varijabilitet je 13,1% (Nagelkerke R<sup>2</sup>), a klasifikaciona moć modela 66%.

Modelovanje je urađeno u nekoliko koraka. Prvo je ispitana razlika između pacijenata sa TAI da i TAI ne. Zatim je kao zavisna varijabla uzeta trudnoća. Ispitani su svi faktori po kojima se razlikuju pacijentkinje koje su ostvarile trudnoću i one koje nisu. Zatim je urađeno hijerarhijsko modelovanje. U prvom koraku je u model ušla varijabla TAI kao obavezna. U sledećem koraku su uvedene varijable Log Progesteron (logaritmovani progesteron), prethodna VTO i dugi protokol. U drugom koraku varijable su uvedene pomoću *Forward* metode sa kriterijumom  $p < 0,1$  za ulazak u model.

Finalni model ishoda VTO prikazan je u Tabeli 65.

*Tabela 65. Prediktori ishoda vantelesne oplodnje*

R <sup>2</sup> =0,611				
	p vrednost	OR	95% IP za OR	
			Donji	Gornji
TAI da	,004	,036	,004	,347
Log_Progesteron	,011	56,276	2,542	1245,660
Prethodna VTO	,013	,077	,010	,578
Dugi GnRH-a protokol	,005	50,332	3,235	783,165
Konstanta	,017	,000		

Multivarijantna analiza je pokazala da su TAI, progesteron u folikularnoj tečnosti, prethodna VTO i protokol značajni i nezavisni prediktori ishoda VTO. Žene koje imaju TAI imaju 27,8 (1/0,036) puta manju šansu da ostvare trudnoću u postupku VTO. Pokazano je da je progesteron u folikularnoj tečnosti nezavistan prediktor ishoda VTO i to što je veći progesteron, veća je šansa da žena u postupku VTO ostane trudna. Žene koje su imale prethodnu VTO imaju 12,9 puta (1/0,077) manju šansu da ostvare trudnoću. Daleko veća šansa da se ostvari trudnoća u postupku VTO je ukoliko se koristi dugi protokol za kontrolisanu ovarijalnu stimulaciju (oko 50 puta). Ipak, široki intervali poverenja za OR govore u prilog malog uzorka i ne toliko precizne ocene ovog parametra u populaciji.

## 5. DISKUSIJA

Studijom je ispitano prisustvo tiroidnih autoantitela u folikularnoj tečnosti kod pacijentkinja sa pozitivnim tiroidnim autoantitelima u perifernoj krvi, a potom ocenjen njihov uticaj na postizanje fertiliteta metodom VTO. Na taj način se pokušalo odgovoriti na pitanje da li se i u kojoj meri ishodi VTO, posmatrano kroz broj ostvarenih biohemijskih i kliničkih trudnoća, razlikuju među pacijentkinjama koje imaju i onim koje nemaju pozitivna tiroidna autoantitela. Dobijeni rezultati omogućavaju da se razjasni nepovoljan uticaj tiroidnih autoantitela na fertilitet i pretpostavi mehanizam njihovog delovanja.

Takođe, studija je po prvi put, ispitala prisustvo TSH,  $fT_4$  i progesterona u folikularnoj tečnosti kod pacijentkinja sa pozitivnim tiroidnim autoantitelima u perifernoj krvi i procenila njihov značaj za proces fertilizacije i razvoj embriona metodom VTO.

Grupe pacijentkinja sa i bez TAI se nisu međusobno razlikovale po starosti, BMI, životnim navikama (pušenje, konzumiranje kafe), porodičnoj anamnezi za autoimune bolesti, ličnoj anamnezi za autoimune bolesti, vitiligo i polensku kijavicu, ranijim spontanim pobačajima, prethodnim VTO, ali su se razlikovale po dužini trajanju infertiliteta do momenta ulaska u studiju.

Infertilitet je sve zastupljeniji problem mnogih parova, postoje podaci da čak 400.000 parova u Srbiji ima problem sa začećem. Infertilitet je u poslednje vreme prisutan nezavisno od starosne dobi, zastupljen od mlađeg do starijeg reproduktivnog doba, u našoj studiji od 24 do 40 godina života. U meta analizi Chen i sar. pokazana je nešto starija životna dob TAI pozitivnih žena (razlika od 1,29 godina,  $p=0,003$ ) (161). U saglasnosti sa ovom nalaze se i druge studije kod kojih je pokazana nešto starija životna dob žena sa prisutnim tiroidnim autoantitelima u serumu (135,162). Vrlo slične i statistički bez značaja među grupama, ali diskretno starije životne dobi, jesu i pacijentkinje u ispitivanoj grupi naše studije. Poppe i sar. su pokazali da su godine života nezavistan riziko-faktor za spontani pobačaj sa OR 1,08 ( $p=0,005$ ) (122). Uopšte, što su veće godine života manja je šansa za trudnoću, OR 0,94 ( $p=0,003$ ) (135).

Među pacijentkinjama ispitivane i kontrolne grupe nije bilo statistički značajne razlike u BMI. Prosečne vrednosti BMI u obe grupe odgovaraju normalno uhranjenim, što je delom uslovljeno i inkluzionim kriterijumima propisanim od Republičke stručne komisije Ministarstva zdravlja za postupke BMPO, BMI < 30 kg/m<sup>2</sup>. Ipak, uočava se diskretna razlika u BMI od 1 kg/m<sup>2</sup> više u ispitivanoj grupi. Iako se o pojmu gojaznosti ne može govoriti među pacijentkinjama studijske populacije, sličnost se može zapaziti sa studijom koja je pokazala da se anti TPO At češće nalaze kod gojaznih osoba, a glavni razlog za to mogao bi biti uticaja leptina na razvoj autoimune tiroidne bolesti (76). Starost, stepen uhranjenosti, ali i životne navike kao što su pušački status, konzumiranje kafe, mogu uticati na ishod trudnoće bilo začete prirodnim, bilo putem VTO.

Druge autoimune bolesti među pacijentkinjama nisu bile zastupljene u značajnom broju, ali porodično opterećenje tiroidnom ili drugom autoimunom bolešću u ispitivanoj grupi je veće nego u kontrolnoj 26,9 vs. 7,7%, (p=0,140). U studijama je pokazano da je učestalost tiroidne autoimune bolesti u porodici češća kod žena sa infertilitetom, ali da je prisustvo ne samo tiroidne nego i drugih autoimunih bolesti u porodici češće u ovoj populaciji. Tako je u studiji Quintino-Moro A i sar. među pacijentkinjama sa problemom infertiliteta bilo 36,7% pacijentkinja sa porodičnim opterećenjem za HT vs. 28,6% u grupi bez ovog problema, a taj odnos je bio 60% vs. 51,4% kada se radi o drugim autoimunim bolestima u porodici, respektivno (163). Za očekivati je da postoji povećan titar tiroidnih autoantitela u genetski podložnih osoba i isti predstavlja prve korake u razvoju autoimune tiroidne bolesti (26).

Trajanje infertiliteta do ulaska u studiju među pacijentkinjama koje imaju TAI je kraće u odnosu na kontrolnu grupu (p=0,050). Objašnjenje bi moglo da postoji u činjenici da se u ispitivanju etiologije infertiliteta, u našoj kao i većini drugih zemalja, kao deo programa ispituje hormonski status tiroidne žlezde, dok se tiroidna autoantitela ne ispituju rutinski. Većina pacijenata u ispitivanoj grupi je od ranije imala dijagnostikovanu hipotireozu na bazi HT, dok je kod njih 6 novodijagnostikovana TAI u toku samog studijskog ispitivanja. Time je obezbeđeno ranije uvođenje supstitucije levotiroksinom, ali moguće i ranije odlučivanje za VTO postupak, pa je samim tim je moguća razlika u periodu pokušaja postizanja trudnoće do momenta ulaska u program VTO. U studijama dostupnim u literaturi nije nađena statistički značajna razlika

(121,137,164), niti drugo objašnjenje za ovu razliku u trajanju infertiliteta među pacijentkinjama koje imaju i onim koje nemaju TAI. Nasuprot, Grassi i sar. u svojoj studiji su pokazali da je srednje trajanje infertiliteta među pacijentkinjama sa tiroidnom i ovulatornom disfunkcijom duže nego u kontrolnoj grupi sa pacijentkinjama sa normalnom funkcijom tiroidne žlezde i bez postojanja TAI, ali ako se uzme u obzir grupa žena koje su bile eutiroidne sa TAI nije bilo razlike u dužini trajanja infertiliteta (89). Ovo bi moglo da pokaže razvijeniju svest naše populacije o programu VTO i njegovim benefitima u lečenju infertiliteta, posebno kada postoji dokazan problem koji bi mogao da utiče na postizanje trudnoće prirodnim putem. S druge strane u studiju nisu uključene pacijentkinje kojima je ovo bio prvi postupak VTO; 7 pacijentkinja koje imaju TAI imale su već jednu prethodnu VTO, dok je isti broj onih koje nemaju TAI imao jednu prethodnu VTO, a 2 pacijentkinje su imale već 2 prethodna pokušaja VTO, pa dobijene rezultate treba tumačiti i u tom smislu.

Od ukupno 26 pacijentkinja ispitivane grupe koja ima TAI, njih 16 (61,54%) je imalo od ranije postavljenu dijagnozu hipotireoze na bazi HT, 4 (15,38%) pacijentkinje HT i sve su bile od ranije na supstituciji levotiroksinom. Kod 6 (23,08%) pacijentkinja povišena tiroidna autoantitela (anti TPO At i/ili anti Tg At) su dijagnostikovana tokom studije. Medijana vremena postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti u odnosu na ispitivanje je 2 godine, a ako se izuzmu novodijagnostikovane pacijentkinje 3 godine i mesec dana, dok je medijana trajanja terapije nešto duža od godine i po dana, a medijana ukupne doze levotiroksina blizu 60 mcg.

U studiji je pokazana pozitivna i statistički značajna korelacija anti TPO At u serumu ( $Rho=0,445$ ,  $p=0,023$ ) i folikularnoj tečnosti ( $Rho=0,403$ ,  $p=0,041$ ) sa vremenskim periodom od postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti do početka ispitivanja, što je i očekivano za tok HT. Dakle, što je bio duži period do ulaska u VTO program, rastao je i titar antitela i verovatno se smanjivala šansa za uspeh same metode. Značajna korelacija vremenskog perioda od postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti do početka ispitivanja sa trajanjem infertiliteta do ulaska u studiju nije nađena. Nije pokazana ni korelacija sa brojem i kvalitetom jajnih ćelija i embriona. Iako nije bilo statistički



značajne razlike, shodno rezultatima, evidentno je da je vreme postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti do ispitivanja bilo duže kod pacijentkinja koje nisu ostale trudne.

Rezultati su pokazali da postoji pozitivna korelacija blizu konvencionalnog nivoa značajnosti i solidne jačine, između dužine uzimanja terapije i anti TPO At u serumu (Rho 0,425,  $p=0,062$ ), kao i sa istim antitelima u folikularnoj tečnosti, ali bez statističke značajnosti (Rho 0,350,  $p=0,131$ ), što bi se moglo objasniti činjenicom da bez obzira na redovno uzimanje terapije i adekvatnu dozu, vremenom raste titar antitela. Titar antitela je vrlo promenljiv tokom vremena uzrokujući oštećenje tireocita.

Pokazano je da nije bilo statistički značajnih razlika u odnosu na TSH ( $p=0,324$ ) i fT3 ( $p=0,135$ ), ali je postojala značajna razlika u odnosu na fT<sub>4</sub> ( $p=0,006$ ) u smislu viših prosečnih vrednosti u podgrupi sa TAI, gde je primenjena terapija levotiroksinom, u odnosu na podgrupu TAI bez terapije.

Eho pregled štitaste žlezde je pokazao da je kod najvećeg broja pacijentkinja tiroidna žlezda bila nehomogena i hipoehogena, sa većim procentom mikronodularnosti što odgovara očekivanom nalazu HT. Prokrvljenost tiroidne žlezde je u 61,5% pacijentkinja bila normalna. Ista varira i zavisi od stadijuma bolesti (165). Volumeni oba lobusa su manji od očekivanih prosečnih, nešto većeg desnog nego levog lobusa, što je zapaženo i u drugim populacijama (166,167).

Prema podeli SZO samo jedna pacijentkinja je imala sekundarni infertilitet, sve ostale su imale problem primarnog infertiliteta.

Sveukupno gledano, najveća je bila zastupljenost muškog infertiliteta 42,3%, potom infertiliteta nepoznatog uzroka 25%, ženskog 19,2%, pa mešovitog 13,5%. Među grupama, iako nije postojala statistički značajna razlika, može se zapaziti sličnost u distribuciji infertiliteta nepoznatog uzroka 23,1% TAI Da vs. 26,9% TAI Ne, dok je problem muškog infertiliteta bio zastupljeniji u grupa sa TAI 53,8% vs. 30,8%, a problem mešovitog i ženskog infertiliteta u grupi pacijentkinja bez TAI 19,2% i 23,1% vs. 7,7% i 15,4% redom. Nije bilo statistički značajne razlike među grupama ni kada se uzmu u obzir pojedinačni uzroci ženskog infertiliteta. U studiji Poppe i sar. među 438 žena sa infertilitetom, muški infertilitet je bio zastupljen u 38%, infertilitet nepoznatog uzroka u 17%, ženski u 45% i to 11% endometrioza, 30% tubarni razlog i 59%

ovarijalna disfunkcija (68). PCOS i endometriozna se najčešće 'optužuju' za nastanak ženskog infertiliteta. Među pacijentkinjama sa TAI, ubrajajući i one kojima je to bio jedini uzrok infertiliteta kao i one koje su imale PCOS kao deo kombinovanog muškog i ženskog uzroka infertiliteta, bio je zastupljeniji PCOS (15,4% vs. 3,8%), dok je među pacijentkinjama bez TAI bila češća endometriozna (19,2% vs. 3,8%), ali bez statistički značajne razlike ni za PCOS ( $p=0,350$ ) ni za endometriozu ( $p=0,191$ ). Zastupljenost patološkog spermograma na dan aspiracije jajnih ćelija u obe grupe nije bila statistički značajna, a mogući uticaj lošeg spermograma je prevaziđen primernom ICSI metode.

Iako, kao što je ranije naglašeno, povezanost TAI i PCOS ostaje nerazjašnjen. Evidentno je, kao i u našoj studiji da je zastupljenost PCOS češća među pacijentkinjama koje imaju TAI 15,4% vs. 18,75% pacijenata sa koincidencom PCOS i TAI u studiji Petrikova i sar. (168). Prema dostupnoj literaturi, kod pacijentkinja sa PCOS zastupljenost TAI je oko 3 puta veća, sa ranijom kliničkom manifestacijom PCOS (169). Naime, 5 do 10 puta veća zastupljenost TAI među ženama, ukoliko se poredi sa muškarcima, korelira sa visokim vrednostima estrogena, koji potencira B ćelijsku aktivnost i autoimuni odgovor, a negativno sa progesteronom koji suprimira autoimuni odgovor. Jedan od glavnih medijatora autoimunog odgovora IL-6 takođe pozitivno korelira sa estrogenom, a negativno sa progesteronom doprinoseći većem estrogen/progesteron odnosu u PCOS. Tim mehanizmima se putevi PCOS i TAI ukrštaju. S druge strane, hipotiroidizam dodatno pogoršava PCOS, zbog hormonskih promena koje nastaju, a podrazumevaju smanjenje nivoa SHBG i povećanje nivoa androgena. PCOS pacijentkinje sa TAI imaju više vrednosti serumskog TSH (170). Veruje se da bi ova dva stanja mogla imati istu i genetsku osnovu, a u prilog tome se navodi još jedan od pretpostavljenih mehanizama-polimorfizam fibrilina 3 (*FBN3*). Kao što je ranije rečeno, Treg inhibišu autoimuni odgovor, a njihovu aktivnost stimuliše *tumor necrosis factor-β* (TGF-β), koji se nalazi pod dejstvom fibrilina. Niske vrednosti TGF-β1 nađene su kod žena sa HT i PCOS koji su nosioci alela 8 D19S884 u *FBN3* genu (171). S obzirom na njihovu, ne tako retku, zajedničku učestalost javljanja, imajući u vidu pojedinačni značaj na nepovoljne ishode na tok trudnoće (172), može se pre kod ovih pacijentkinja očekivati neželjeni ishod postupka VTO.

Kada je reč o endometriozni, naši rezultati su u saglasnosti sa drugim studijama koje nisu potvrdile veću zastupljenost endometrioze i TAI, bez obzira na moguću

zajedničku autoimunu osnovu (173). Međutim, ne može se reći da ova povezanost ne postoji, u studiji Poppe i sar. nađena su anti TPO At kod 29% žena čiji je uzrok infertiliteta bila endometriozna (68).

Naši rezultati pokazuju da različite etiologije infertiliteta nisu imali statistički značajan uticaj na ishod VTO (trudnoća po ET  $p=0.500$ ; trudnoća po započetom ciklusu  $p=0.437$

Takođe, grupe se nisu razlikovale ni u odnosu markere ovarijalne reserve kao što su broj antralnih folikula i AMH izražen i kao apsolutni broj i kao procenat u odnosu na gornji referentni opseg za godine.

Grupe pacijentkinja se nisu razlikovale po protokolu koji je primenjen, broju dana stimulacije, ukupnoj količini primenjenih gonadotropina, koncentraciji serumskog estradiola na dan završne injekcije, metodu fertilizacije koji je primenjen. Rezultati su u saglasnosti sa onim dostupnim u literaturi (121,137,164,174), iako se prema nekim autorima očekuje duže trajanje stimulacije kod žena sa hipotiroidizmom (150).

Ipak, mala razlika, ali nešto više primenjivan je dugi protokol kod pacijentkinja koje imaju TAI, 38,5 vs. 26,9% ( $p=0,375$ ), a zapaža se i nešto veća koncentracija serumskog estradiola na dan završne injekcije,  $7068,7 \pm 2808,7$  vs.  $6718,7 \pm 3122,2$  pmol/l ( $p=0,621$ ). Studije su pokazale da kod pacijentkinja koje ulaze u program VTO, posebno kod kojih se koristi dugi protokol, vrednost serumskog estradiola na dan završne injekcije pozitivno korelira sa stopom kliničke trudnoće (175,176) i nema negativan efekat u smislu prevremenog porođaja, male telesne mase na rođenju ili fetalnih malformacija. Pokazano je da što su niže vrednosti serumskog TSH pre započinjanja procedure, više su serumske vrednosti estradiola na dan aspiracije oocita, ali bi i onda bila veća šansa dobijanja zrele jajne ćelije, sa boljom stopom fertilizacije. U našim rezultatima, više serumske vrednosti estradiola na dan završne injekcije korelirale su sa višim vrednostima TSH u folikularnoj tečnosti, na samoj granici statističke značajnosti, a statistički značajna pozitivna korelacija bila je sa brojem jajnih ćelija ( $p<0,001$ ), brojem kvalitetnih jajnih ćelija ( $p<0,001$ ), ukupnim brojem embriona ( $p<0,001$ ) i brojem *top quality* embriona ( $p=0,029$ ). Međutim, u jednoj subpopulaciji žena sa serumskim vrednostima estradiola  $\geq 3757$  pg/mL na dan hCG injekcije udružen

je sa većim brojem spontanih pobačaja, kod žena starosti preko 37 godina (177). Nisu dostupne studije o vrednosti estradiola na dan završne injekcije kod žena sa TAI. S druge strane, ne slažu se svi autori da vrednost serumskog estradiola na dan završne injekcije ima prediktivnu vrednost u smislu trudnoće, bez obzira koji je protokol primenjen (178).

Naši rezultati su pokazali pozitivnu i statistički značajnu korelaciju broja dana stimulacije i stope fertilizacije ( $p=0,002$ )

U rezultatima se zapaža da što je veća količina gonadotropina za stimulaciju primenjena bila je viša koncentracija progesterona u folikularnoj tečnosti ( $p=0,020$ ), a anti Tg At u serumu ( $p=0,012$ ) i folikularnoj tečnosti ( $p=0,025$ ) su bila u negativnoj korelaciji sa primenjenom količinom gonadotropina. U negativnoj korelaciji količina primenjenih gonadotropina je bila i sa brojem jajnih ćelija ( $p=0,025$ ).

Kratki protokol je primenjen u 61,5% žena sa i 73,1% žena bez TAI. Zapaženo je da kod žena kod kojih je primenjen kratki protokol bila su nešto više vrednosti serumskog TSH ( $p=0,084$ ) i fT3 ( $p=0,073$ ). Dugi protokol je primenjen kod 38,5% žena sa i 26,9% žena bez TAI. Uočava se da su anti Tg At u serumu ( $p=0,147$ ), a sledstveno i folikularnoj tečnosti ( $p=0,091$ ) bila viših prosečnih vrednosti kod primenjenog dugog protokola. Primenom dugog protokola dobijen je veći broj jajnih ( $p=0,011$ ), broj kvalitetnih jajnih ćelija ( $p=0,033$ ), ukupan broj embriona ( $p=0,030$ ), dok blizu odnosno na samoj granici statističke značajnosti je za broj *top quality* embriona ( $p=0,072$ ), broj transferisanih embriona ( $p=0,052$ ). Pacijentkinje sa dugim protokolom imaju statistički značajno veći broj uspešnih VTO u odnosu na pacijentkinje na kratkom protokolu. Iz ovih rezultata bi se moglo pretpostaviti, da bi dugi protokol mogao biti bolja opcija za pacijentkinje sa TAI, posebno anti Tg At, u cilju povećanja uspešnosti VTO, mada statističke razlike među grupama po primenjenim protokolima nije bilo.

Pacijentkinje kod kojih je primenjen ICSI metod imale su više serumske prosečne vrednosti fT<sub>4</sub> ( $p=0,049$ ), a niže prosečne vrednosti TSH u folikularnoj tečnosti ( $p=0,038$ ). Kombinacija IVF i ICSI metoda dala je veći broj jajnih ćelija ( $p<0,001$ ), kvalitetnih jajnih ćelija ( $p=0,006$ ), ukupan broj embriona ( $p=0,007$ ) i broj *top quality* embriona ( $p=0,004$ ).

Naši rezultati pokazuju da su prosečne serumske vrednosti TSH pre započinjanja protokola za kontrolisanu ovarijalnu stimulaciju značajno veće kod žena koje nemaju TAI nego kod onih sa TAI  $2,22 \pm 0,89$  vs.  $1,63 \pm 0,65$   $\mu$ IU/ml ( $p=0,010$ ), kao i prosečne serumske vrednosti  $fT_3$   $5,51 \pm 0,49$  vs.  $4,89 \pm 0,68$  pmol/l ( $p=0,001$ ), dok je prosečna serumska vrednost  $fT_4$  u grupi žena sa TAI viša nego u grupi koja nema TAI,  $19,95 \pm 3,56$  vs.  $17,76 \pm 1,84$  pmol/l ( $p=0,008$ ). Medijana anti TPO At kod žena sa TAI iznosila je 56,50 IU/ml (5,50-600,00 IU/ml), dok je u kontrolnoj grupi bez TAI bila 11,35 IU/ml (6,80-25,50 IU/ml),  $p<0,001$ , a medijana anti Tg At 66,14 IU/ml (9,00-2380,00 IU/ml) u grupi sa TAI i 9 IU/ml (9,0-22,99 IU/ml) u grupi bez TAI,  $p<0,001$ .

Rezultat koji se odnosi na prosečne vrednosti TSH,  $fT_4$  i  $fT_3$  bi se mogao objasniti činjenicom da je kod većine pacijentkinja koje imaju TAI od ranije postavljena dijagnoza HT sa ili bez hipotiroidizma i uvedena supstitucionna terapija prema važećim preporukama (22), u cilju postizanja adekvatnih vrednosti TSH pre ulaska u program VTO (71,134). Često, ipak ni to nije dovoljno, jer i pored adekvatne supstitucije levotiroksinom žene koje imaju hipotiroidizam imaju manje šanse da ostvare trudnoću putem VTO (148). Studije su pokazale da primena levotiroksina kod žena koje imaju TAI sa ili bez hipotiroidizma, omogućava smanjenje stope spontanih pobačaja ili prevremenog porođaja (63,103), ali ne i ukoliko se poredi sa grupom žena bez tiroidne disfunkcije i bez TAI (63). Međutim, u dostupnim studijama u literaturi uglavnom su povišene vrednosti serumskog TSH bile kod pacijentkinja sa TAI u odnosu na one bez TAI (80,128). Ta razlika najčešće nije bila velika, u meta analizi Chen i sar. i iznosi 0.61 mIU/l (161). Slično se nalazi i u meta analizi Busnelli i sar. ali ne postoji povezanost TSH sa stopom trudnoće, međutim ni statistički značajna razlika u stopi trudnoće između TAI pozitivne i negativne grupe žena (179).

Ipak, prosečna vrednost  $fT_3$  kao aktivne supstance koja ostvaruje dejstvo na periferiji je bila viša u grupi žena bez TAI. Ranije je pomenuto, da zreli MII ekspresuju TSHR,  $TR\alpha 1$  i  $TR\beta 1$  i u sadejstvu sa dejodinazama D2 i D3, omogućavaju perifernu konverziju TH na ovarijalnom tkivu, a  $T_3$  ostvaruje direktan efekat na jajne ćelije (5,6) i granulosa ćelije u sadejstvu sa FSH. Naime,  $T_3$  se smatra biološkim 'pojačivačem' stimulatornog efekta gonadotropina na funkciju granulosa ćelija (120). Međutim,  $fT_3$  ima efekat i na razvoj placente i time je njegov značaj u ostvarivanju trudnoće putem VTO veći. Rezultati jedne preliminarne opservacione studije pokazali su da relativno

niske koncentracije  $fT_3$  kod žena sa HT na supstituciji levotiroksinom mogu doprineti većoj stopi infertiliteta (180), što je bio slučaj i kod naše grupe pacijentkinja sa TAI. U studiji Monteleone i sar. nije pokazana značajna razlika u prosečnim serumskim vrednostima TSH,  $fT_4$  i  $fT_3$  između TAI pozitivne i negativne grupe (181).

Tokom procesa mejoze na putu sazrevanja folikula potrebna je energija koja se obezbeđuje metaboličkom aktivnošću ćelije, u cilju normalne folikulogeneze. Poremećaj u molekularnom sastavu folikularne tečnosti, ali i nemogućnosti obezbeđivanja energije, vodi neadekvatnoj folikulogenezi, a potom i nedovoljno kvalitetnoj jajnoj ćeliji, od čega zavisi uspeh fertilizacije. Samim tim, sastav folikularne tečnosti ima ulogu od velike važnosti za determinisanje kvaliteta jajne ćelije, ali i uspešnosti ostvarivanja trudnoće, kako prirodnim, tako i putem VTO.

Imajući u vidu dostupnu literaturu, po prvi put je dokazano prisustvo TSH i  $fT_4$  u folikularnoj tečnosti pacijentkinja sa TAI. Dobijene prosečne vrednosti TSH i  $fT_4$  u folikularnoj tečnosti u našoj studiji se nisu razlikovale među grupama pacijentkinja koje su imale i onih koje nisu imale TAI (TSH  $1,52 \pm 0,94$   $\mu$ IU/ml TAI Da vs.  $1,54 \pm 0,76$   $\mu$ IU/ml TAI Ne,  $p=0,921$ ;  $fT_4$   $16,28 \pm 2,36$   $\mu$ IU/ml TAI Da vs.  $15,70 \pm 1,73$   $\mu$ IU/ml TAI Ne,  $p=0,319$ ). Korelacija TSH i  $fT_4$  u folikularnoj tečnosti sa ishodima u našoj studiji je zanemarljiva, a nema ni statistički značajne razlike u odnosu na trudnoću po ET. Studija De Silva i sar. je pokazala prisustvo TSH u folikularnoj tečnosti, ali bez značajne razlike u vrednostima serumskog i TSH u folikularnoj tečnosti, s tim da je serum za analizu uzet na dan injekcije hCG-a (182). U našoj studiji korelacija TSH u serumu i folikularnoj tečnosti ( $p < 0,001$ ), kao  $fT_4$  u serumu i folikularnoj tečnosti je solidne jačine ( $p < 0,001$ ). Prisustvo TH je dokazano u folikularnoj tečnosti (183), a postoje podaci da je kod žena sa infertilitetom koncentracija  $fT_4$  viša u folikularnoj tečnosti nego kod zdrave populacije (184). Imajući ovo u vidu, neka buduća istraživanja u smislu poređenja ovih parametara žena sa TAI i problemom infertiliteta, sa ženskom populacijom bez problema infertiliteta bi nam mogla pomoći u razjašnjenju ovog zanimljivog podatka.

Grupa pacijentkinja sa TAI je imala značajno više prosečne vrednosti anti TPO At i anti Tg At u folikularnoj tečnosti nego grupa pacijentkinja koje nisu imale TAI, medijana anti TPO At 27,73 (4,00-525,20 IU/ml) vs. 4,00 (4,00-89,80 IU/ml),  $p < 0,001$ , a anti Tg At 38,29 (9,00-1488,00 IU/ml) vs. 9,00 (9,00-18,35 IU/ml),  $p < 0,001$ . Monteleone i sar. su prvi put, istina na malom uzorku, pokazali prisustvo tiroidnih

autoantitela u folikularnoj tečnosti kod žena sa TAI (17 pacijentkinja), pa bi se moglo pretpostaviti da tiroidna autoantitela mogu proći krvno-folikularnu barijeru i ostvariti efekat na jajnu ćeliju koja će se koristiti u daljem postupku VTO (181). U prilog tome je i vrlo visoka i statistički značajna korelacija serumskih i antitela u folikularnoj tečnosti u našim rezultatima za anti TPO At ( $p < 0,001$ ), za anti Tg At ( $p < 0,001$ ), a takođe i rezultati po grupama koji su pokazali značajnu pozitivnu korelaciju između serumskih i anti TPO At u folikularnoj tečnosti (0,961,  $p < 0,001$ ) kao i serumskih i anti Tg At u folikularnoj tečnosti (0,945,  $p < 0,001$ ) u TAI pozitivnoj grupi i značajnu korelaciju između serumskih i anti TPO At u folikularnoj tečnosti (0,438,  $p = 0,025$ ) kao i serumskih i anti Tg At u folikularnoj tečnosti (0,554,  $p = 0,003$ ) u TAI negativnoj grupi. Studija Monteleone i sar. pokazala je duplo manje vrednosti anti TPO At i anti Tg At u folikularnoj tečnosti u odnosu na serumske, koja su u pozitivnoj korelaciji sa serumskim anti Tg At u folikularnoj tečnosti i serumu redom  $245,8 \pm 322,5$  i  $541,8 \pm 817,9$  IU/mL ( $r = 0,95$ ,  $p < 0,05$ ) i anti TPO At u folikularnoj tečnosti i serumu redom  $465,9 \pm 551,5$  i  $820,6 \pm 1112,4$  IU/mL ( $r = 0,99$ ,  $p < 0,05$ ) (181).

Po prvi put, u našoj studiji dokazano je prisustvo progesterona u folikularnoj tečnosti kod žena sa TAI. Međutim, nije pokazana razlika u prosečnim vrednostima progesterona u folikularnoj tečnosti kod žena sa i bez TAI, redom  $21724,2 \pm 12157,3$  ng/ml,  $20676,6 \pm 11764,9$  ng/ml,  $p = 0,754$ . Nije pokazana statistički značajna korelacija progesterona u folikularnoj tečnosti sa tiroidnim autoantitelima ni u serumu ni u folikularnoj tečnosti. Više vrednosti progesterona u folikularnoj tečnosti su primećene kod osoba sa ostvarenom trudnoćom, uz graničnu statističku značajnost. Upravo je progesteron glavni steroidni produkt luteiniziranih teka i granulosa ćelija folikula, tj. žutog tela (*corpus luteum*). Progesteron ima brojne imunomodulatorne efekte u cilju smanjenja majčinog imunog odgovora na fetalni alograft, indukuje transformaciju stromalnih ćelija u decidualne sa pridruženom infiltracijom NK ćelija i makrofaga, potencira efekat Th2 ćelija nad efektom Th1 ćelija, smanjuje B ćelijsku aktivnost, suprimira inflamatorni proces, uzrokuje porast osteopontina, proteina matriksa, koji povezuje embrion sa endometrijumom. Postoje podaci koji govore o značaju preovulatornog progesterona kao markera ili maturacije jajne ćelije ili veličine folikula (185). Podaci upućuju da su jajne ćelije sa normalnom fertilizacijom dobijene iz folikula sa višim koncentracijama progesterona u poređenju sa jajnim ćelijama koje nisu

oplođene (186). Njegova sekrecija, od strane granulosa ćelija, u folikularnoj tečnosti, prema dosadašnjim saznanjima, ima dve važne implikacije. Prva da stimuliše maturaciju jajnih ćelija, a druga da tokom ovulacije ulazi u Falopijeve tube i omogućava formiranje koncentracionog gradijenta za privlačenje spermatozoida. Veruje se da postoji gornja granica koncentracije u folikularnoj tečnosti nakon koje progesteron gubi pozitivan efekat na maturaciju jajnih ćelija, već počinje da pogoršava kvalitet istih (105). Naime, pokazano je da folikularna tečnost žena sa niskom ovarijalnom rezervom u programu VTO, sadrži visoke vrednosti progesterona (187). Progesteronski receptori su dokazani i na placenti (188), pa bi se moglo pretpostaviti da visoke koncentracije progesterona mogu ostvariti direktan negativan efekat i na placentu, a ne samo na jajnu ćeliju. Ipak, kod žena kod kojih je primenjena ICSI metoda uočene su više vrednosti progesterona u folikularnoj tečnosti u slučajevima uspešne fertilizacije u odnosu na neuspehu fertilizaciju ( $p=0.003$ ), ukazujući da progesteron u folikularnoj tečnosti može biti marker kvaliteta jajne ćelije i njenog razvoja (189). Publikacije upućuju da visoke koncentracije progesterona u folikularnoj tečnosti i visok odnos progesterona i estradiola, kod pacijentkinja koje ulaze u program VTO, može biti prediktivan za fertilizaciju, implantaciju i trudnoću, kao i da se povišene srednje koncentracije progesterona u folikularnoj tečnosti nalaze kod žena koje su ostvarile trudnoću, verovatno kao posledica progresivne luteinizacije folikula (105,190–193). Nivo estradiola u folikularnoj tečnosti i odnosa estradiola i progesterona definiše kvalitet jajne ćelije i vodi uspešnoj trudnoći (194). Ipak, neki autori nisu našli vezu između nivoa progesterona u folikularnoj tečnosti i kvaliteta embriona (195).

Naši rezultati nisu pokazali razliku u broju jajnih ćelija ( $p=0,474$ ), broju ( $p=0,869$ ) i procentu kvalitetnih jajnih ćelija ( $p=0,748$ ), kao ni stopi fertilizacije sa identičnom medijanom od 71.43% u grupi pacijentkinja sa i bez TAI ( $p=0,676$ ). Na osnovu ovih rezultata bi se moglo pretpostaviti, da tiroidna autoantitela nemaju direktan uticaj na jajnu ćeliju, ne oštećuju njeno sazrevanje niti utiču na njen kvalitet, bez obzira što se nalaze u folikularnoj tečnosti, kao što je prethodno pokazano. To se donekle suprotstavlja pretpostavljenom mehanizmu delovanja tiroidnih autoantitela putem molekularne mimikrije na zonu pelucidu. Naime, studije su pretpostavile zona pelucida



i tiroidno tkivo dele iste antigene, što znači da bi zona pelucida mogla biti meta delovanja tiroidnih autoantitela mehanizmom molekularne mimikrije (196). Za pacijentkinje koje ulaze u program VTO, ICSI bi mogao biti metod izbora, jer se na taj način izbegava kontakt spermatozoida sa zonom pelucidom jajne ćelije (135,181).

Kada je reč o broju dobijenih jajnih ćelija, slični se rezultati se nalaze i u drugim studijama (121,137,197). Rezultati nekih studija pokazuju manju stopu fertilizacije u grupi sa pozitivnim tiroidnim autoantitelima prema grupi koja ima negativna tiroidna autoantitela, 64,3 vs. 74,6% ( $p < 0,001$ ) (121), 63 vs. 72% (181), a slično je pokazano i kod hipotiroidnih žena na supstituciji levotiroksinom 75 vs. 86% (150), a subgrupe sa i bez TAI u poređenju sa klinički manifestnim i subkliničkim hipotiroidizmom nisu potvrdile ove rezultate. Ipak, da ova razlika u stopi fertilizacije žena koje imaju i onih koje nemaju TAI nije uvek prisutna potvrđuju i druge studije što odgovara našim rezultatima (137,197).

Naši rezultati nisu pokazali razliku u ukupnom broju embriona ( $p = 0,417$ ), kao ni broju *top quality* embriona ( $p = 0,350$ ), iako se mogao zapaziti nešto veći, ali statistički bez značaja, broj embriona u grupi pacijentkinja sa TAI i to sa medijanom 5 vs. 4 u grupi sa TAI i bez TAI redom. Kao i kada je reč o uticaju na jajne ćelije, na osnovu ovih rezultata bi se moglo pretpostaviti, da tiroidna autoantitela nemaju direktan uticaj na embrion niti utiču na njegov kvalitet, što ne ide u prilog da antitela imaju uticaj na preimplantacioni embrion, kako je pokazano na animalnom modelu (198). I dok su neke studije u saglasnosti sa našim rezultatima (137,197), Zhong i sar. su pokazali niži broj ukupnih embriona u grupi sa TAI ( $p = 0,01$ ), iako nije bilo statistički značajne razlike u broju transferisanih embriona ( $p = 0,086$ ) (121). Vrlo interesantna povezanost, nađena je između dužine uzimanja terapije i broja transferisanih embriona ( $Rho 0,310$ ,  $p = 0,210$ ). Kod žena sa SCH u programu VTO, iako u stopi kliničke trudnoće po ciklusu nije bilo razlike između grupa žena sa SCH sa i bez supstitucije levotiroksinom, broj embriona gradusa I i II je bio veći u grupi sa supstitucijom, kao i stopa implantacije embriona i stopa živorođenosti, dok je stopa spontanih pobačaja bila manja (174).

Kod tri pacijentkinje grupe sa TAI nije urađen ET, a u grupi bez TAI kod dve. Grupe se nisu međusobno razlikovale ni po broju transferisanih embriona sa identičnom

medijanom koja je iznosila 2 transferisana embriona i to najmanje jednim, a najviše tri ( $p=0,516$ ), kao i bez razlike kojeg dana je rađen ET, 2. ili 3. dana od aspiracije jajnih ćelija ( $p=0,932$ ), što je u saglasnosti sa drugim studijama (121,197).

U našoj studiji pokazana je pozitivna korelacija i serumskih i anti Tg At u folikularnoj tečnosti sa brojem jajnih ćelija ( $p=0,025$ ) i ( $p=0,014$ ) redom, ukupnim brojem embriona ( $p=0,041$ ) i ( $p=0,016$ ) redom i brojem top *quality* embriona ( $p=0,049$ ) i ( $p=0,035$ ) redom. Takođe, korelacija anti TgAt u folikularnoj tečnosti je na granici statističke značajnosti sa brojem kvalitetnih jajnih ćelija ( $p=0,057$ ). Time bi se moglo pretpostaviti da su ova antitela 'manje citotoksična' nego anti TPO At i bez značajnog uticaja na jajnu ćeliju i embrion.

Naši rezultati nisu pokazali postojanje statistički značajne razlike između grupa u odnosu na stopu implantacije, dok postoje publikacije koje ukazuju na značajno nižu stopu implantacije u žena sa TAI (121). Zapažena je se negativna korelacija  $fT_4$  u serumu sa stopom implantacije, dok je stopa implantacije bila veća kod žena sa primenjenim dugim protokolom. Uzimajući u obzir prethodno navedeno, moglo bi se pretpostaviti da tiroidna autoantitela mogu imati efekat na postimplantacioni embrion, kao što je pokazano u studiji sa modelom miša gde su anti TPO At uticala na postimplantacioni razvoj embriona, što je dovelo do gubitka fetusa (198).

Među našim pacijentkinjama sve koje su ostvarile biohemijsku, ostvarile su i kliničku trudnoću. U dobijenim rezultatima bez obzira da li je trudnoća računata po ET ili započetom ciklusu, značajna razlika u stopi ostvarenih trudnoća je bila među grupama, u korist grupe bez TAI i to 66,7 vs. 34,8% računato po ET ( $p=0,029$ ), a 61,5 vs. 30,8% računato po započetom ciklusu ( $p=0,026$ ). U grupi koja nema TAI 50% trudnoća je bilo gemelarno, dok je u grupi sa TAI 25%, bez statističke značajnosti ( $p=0,388$ ). Razlika u stopi ranih spontanih pobačaja između grupa nije postojala ( $p=0,536$ ). U studiji u kojoj je 79 žena zbog tubarnog ili infertiliteta nepoznatog uzroka ušlo u program VTO, 29,1% je imao TAI i bile su eutiroidne, stopa kliničke trudnoće je bila daleko manja 26,3% prema 39,3% u grupi bez TAI, dok je biohemijska bila zastupljena sa 18,4% u grupi sa TAI i 5,6% u kontrolnoj grupi (197).

I u ranijim izlaganjima je pokazan značaj tiroidnih autoantitela na ishode VTO. Generalno, prisustvo TAI ima negativnu prediktivnu vrednost za ishode trudnoće, u smislu smanjenja stope trudnoće, a povećanja stope spontanih pobačaja kako kod prirodne (199–202), tako i trudnoće ostvarene putem VTO. Prisustvo tiroidnih autoantitela povezano sa je neobjašnjenim subfertilitetom (OR-skr.od odds ratio 1,5) (88), povećanim rizikom od spontanih pobačaja (OR 3,73) (88), ponavljanim spontanim pobačajima (OR 2,3) (88), prevremenim porođajem (OR 1,9) (88). Pokazano je da je kombinovani relativni rizik (RR) prevremenog porođaja za trudnice sa TAI u poređenju sa referentnom grupom 1,41 i to za podgrupu sa anti TPO At RR je bio 1,69,  $p=0,003$ , dok nije bilo očiglednog rizika od prevremenog porođaja za podgrupu sa anti Tg At u odnosu na referentnu, RR 0,88,  $p=0,513$  (203). Nađena je povezanost TAI i sa drugim neželjenim događajima peri- i postnatalno i to: maternalnim postporođajnim tiroiditisom (OR 11,5) (88), tri puta češćom pojavom placentalne abrupcije (162), zatim većom perinatalnom smrtnošću, respiratornim distres sindromom i usporenim neurokognitivnim razvojem (204–206), niskim skorovima koji procenjuju intelektualni (OR 6,7) (205) i motorni razvoj (OR 8,3) (207). Doprinoseći uticaj ulozi tiroidnih autoantitela u nastanku prevremenog porođaja može imati prevremena ruptura amnionske membrane verovatno kao posledica inflamacije (208).

ROC analizom u našoj studiji je pokazano da vrednost serumskih anti TPO At je prediktivna u smislu ishoda VTO, ali *cut-off* vrednost nije računata, jer iako blizu konvencionalnog nivoa značajnosti, nije bila statistički značajna ( $p=0,085$ ). Vrednosti serumskih anti Tg At, kao i tiroidnih autoantitela u folikularnoj tečnosti nisu pokazale statističku značajnost kao mogući prediktivni markeri ishoda VTO. Gornja granica titra serumskih antitela u dostupnim studijama u literaturi se razlikuje, ali najčešće se upotrebljava ona od 50 do 100 kU/l za anti TPO At, kao granica za TAI pozitivnost (88). Tako, u studiji Zhong i sar. stopa trudnoće u grupi koja ima i nema TAI iznosila je 33.3 vs. 46.7%, respektivno ( $p=0,002$ ), a stopa spontanih pobačaja 26.9 vs. 11.8% nakon IVF tretmana ( $p=0,002$ ) (121). Kilic i sar. nisu našli da TAI ima uticaj na broj jajnih ćelija, broj i kvalitet embriona, stopu fertilizacije, biohemijske trudnoće i pobačaja, ali značajno je niža među ovim ženama bila stopa kliničke trudnoće,  $p=0,024$  (209). Učestalost spontanih pobačaja kod žena sa TAI je 2 do 5 puta veća nego u žena bez TAI (65). Naime, Thangaratinam i sar. su u meta analizu uključili 31 studiju (19 kohortnih i

12 *case-control* studija) sa 12 126 žena i pokazali da je za spontane pobačaje OR 3,90 ( $p < 0,001$ ) za kohortne studije, odnosno 1.80 ( $p = 0,002$ ) za *case-control* studije, a da se RR smanjuje 52% sa primenom levotiroksina (81). Zapažen je znatno veći rizik za rani spontani pobačaj tokom prvog trimestra (210). U našoj studiji su posmatrani samo rani sponatni pobačaji, čime se može tumačiti nepostojanje razlike između grupa po ovoj posmatranoj varijabli, a i ograničenje postoji zbog same veličine uzorka. Glioner i sar. dokumentovali su oko 4 puta veću stopu gubitaka trudnoće kod eutiroidnih žena sa TAI u odnosu na one bez TAI. (13,3 vs 3,3%,  $p < 0.001$ ) (211). Kod žena sa TAI najčešći su sponatni pobačaji u prvom trimestru kada je fetus zavistan od majčinih TH, za razliku od onih u npr. antifosfolipidnom sindromu koji se dešavaju oko 22. nedelje gestacije (70). Lejeune i sar. su posmatrali 363 žena u prvom trimestru trudnoće, 21 je imala sponatni pobačaj, a od njih je 22% imalo TAI (212), a Mecacci i sar. su pokazali da su 37,9% žena sa istorijom ranih spontanih pobačaja imale TAI (213). S obzirom da fetalne koncentracije  $fT_4$  i  $fT_3$  su i do sto puta niže od koncentracija u majčinoj krvi, male redukcije vrednosti TH u majčinoj krvi uzrokuju znatno sniženje vrednosti istih u fetusu, a time se povećava stopa neželjenih ishoda trudnoće, ali i postpartalnih konsekvenci na fetus.

Neke meta analize nisu potvrdile značaj TAI u smanjenju stope kliničke trudnoće (124), već isključivo u povećanju stope spontanih pobačaja, nakon IVF-a, sa RR 1,54 (125), RR 1,99 (77), a u nekim studijama kao što je meta analiza Chen i sar. koja je uključila 22 studije OR za spontane pobačaje iznosio je čak 2.55 u 8 *case-control* studija, a 2,31 u 14 kohortnih studija (161). Kim i sar. su pokazali da u grupi žena u programu VTO i sa TAI je veća stopa spontanih pobačaja 40% (197). Pokazano je da se spontani pobačaji dešavaju ranije u grupi žena sa SCH (6,5 +/- 0,9 nedelja), potom u grupi sa TAI (8,2 +/- 2,1 nedelja), u poređenju sa eutiroidnim ženama (8,2 +/- 1,6 nedelja) ( $p = 0,020$ ) (214). Međutim, Muller i sar. nisu našli razliku u broju spontanih pobačaja među TAI pozitivnih i TAI negativnih žena (215).

Sakar i sar. nisu potvrdili negativan uticaj TAI na ishode VTO (164), ali i druge sudije, čiji rezultati nisu u saglasnosti sa našim (66,137,140,215).

U našim rezultatima pokazane su nešto više vrednosti serumskog  $fT_4$  ( $p = 0,017$ ) kod pacijenata bez trudnoće, dok je razlika u vrednosti progesterona u folikularnoj tečnosti blizu konvencionalnog nivoa značajnosti bila viša u grupi u kojoj je ostvarena

trudnoća ( $p=0,060$ ). Više puta je naglašen značaj imunog efekta progesterona za embrion i održavanje trudnoće. Međutim, moguće je da u slučaju žena koje imaju TAI njegov efekat izmenjen, kao kod onih sa niskom ovarijalnom rezervom (187) ili da je dostigao onu 'kritičnu granicu' u folikularnoj tečnosti kada se njegov protektivni efekat gubi (105).

Takođe, naši rezultati su pokazali da je vremenski period od postavljanja dijagnoze tiroidne bolesti do ulaska u ispitivanje duži kod pacijentkinja koje nisu ostale trudne ( $Z=-0,346$ ,  $p=0,756$ ). Dakle, što duže tiroidna bolest traje manja je šansa za ostvarivanje potomstva metodom VTO.

Kao što je ranije navedeno, TAI može biti rezultat generalne aktivacije imunskog odgovora, ali može i vremenom razotkriti klinički manifestnu tiroidnu disfunkciju. Male promene u vrednosti TSH dovode do značajnih promena u krajnjim ishodima trudnoće, a očekuje se veći porast TSH u grupi žena sa pozitivnim tiroidnim autoantitelima i bez prethodne tiroidne disfunkcije, nego kod žena koje nemaju pozitivna tiroidna autoantitela u perifernoj krvi. Pokazano je da primena levotiroksina kod žena sa TAI utiče na smanjenje stope pobačaja. Visoko normalne vrednosti TSH su često udružene sa TAI i povećavaju stopu neuspelih trudnoća i sledstvenih pobačaja nakon ART-a (124,126), zato je potrebna adekvatna supstitucija levotiroksinom prema važećim preporukama. Negro i sar. su poredili pacijente koje ulaze u program ART-a u tri grupe, sa TAI na supstituciji levotiroksinom, sa TAI bez terapije i bez TAI (147). Nisu dokazali da primena terapije utiče na povećanje stope trudnoće, ali skoro je duplo veća šansa za gubitak trudnoće ukoliko žena sa TAI ne uzima terapiju. Supstitucija levotiroksinom kod žena sa SCH i/ili TAI koje ulaze u program VTO, povećava značajano stopu porođaja ( $RR\ 2.76$ ,  $p=0.018$ ), smanjuje stopu spontanih pobačaja ( $RR\ 0.45$ ,  $p=0.010$ ), bez značajnog efekta na broj jajnih ćelija, zrelih jajnih ćelija, transferisanih embriona, stopu kliničke trudnoće, ali uz povećanu stopu fertilizacije i implantacije (216). Abalovich i sar. nisu našli razliku u procentu TAI među 244 žena sa infertilitetom i 155 zdravih žena bez ovog problema, a primenom levotiroksina postignuta je stopa uspešnosti trudnoće od 44% u SCH grupi, koja je dijagnostikovana u 14% žena sa infertilitetom i 4% kontrola. SCH je u ovoj studiji definisana kao TSH preko 4.22 mIU/l, TRH preko 26.6 mU/l (100). Slično definisana bila je SCH i u drugim

studijama na ovu temu (68,89). Neke publikacije pretpostavljaju da su tiroidna autoantitela veći razlog neuspele VTO, nego li same vrednosti TSH (217).

Negro i sar. su u retrospektivnoj kohortnoj studiji, među 416 eutiroidnih žena, od čega 10.2% sa TAI, pokazali da je u grupi TAI bilo 50.0%, a u kontrolnoj 62.5% kliničkih trudnoća, a spontanih pobačaja, 23.8% u TAI i 11.5% u kontrolnoj grupi, dok je porođaja bilo 76.2% u TAI i 88.5% u kontrolnoj grupi (124).

Kod žena koje su imale tri ili više neuspehli pokušaja VTO, nađena je nešto veća procentualna zastupljenost tiroidnih autoantitela, koja su dodatni otežavajući faktor ostvarenju trudnoće, pored drugih razloga za VTO, kao što su mehanički ili infertilitet nepoznatog uzroka (119).

Predložene su tri 'radne hipoteze' o mogućem etiološkom uzročniku povećanih gubitaka trudnoće u žena sa TAI (11,69,77,216). U prvoj hipotezi gubitak trudnoće nije direktno povezan sa tiroidnim autoantitelima, već više posledica autoimune neravnoteže kojom bi se moglo objasniti veća stopa odbacivanja 'fetalnog grafta', a tiroidna autoantitela su samo posledica generalizovanog autoimunog odgovora (77). Druga hipoteza ukazuje da i pored evidentnog eutiroidizma, prisustvo TAI može biti u vezi sa blagom deficijencijom TH, ili čak sa manjom sposobnošću tiroidne žlezde da se adaptira na hormonske promene u trudnoći, jer je osnovna karakteristika HT smanjena rezervna tiroidna funkcija (216). Porast TSH, mogao bi razotkriti SCH ili čak i manifestni hipotiroidizam, kada postaje sasvim jasno da promene na nivou TSH i prolaktina utiču na odlaganje odgovora LH na aktivnost oslobađajućeg hormona luteinizirajućeg hormona (LHRH) i smanjenje gonadne funkcije. To bi značilo da ukoliko TSH može da aktivise LH i hCG receptore, istim mehanizmom bi TSHR blokirajuća At mogla da se vežu za ove receptore u *corpus luteumu* i blokiraju ih (218). Ovaj podatak ne iznenađuje, ako se uzme u obzir zastupljenost SCH među ženama sa problemom infertiliteta (89,100,219). Definisana je čak i granična vrednost, koja bi mogla biti prediktivni marker da se do kraja trudnoće može razviti hipotiroidizam. Naime, TSH preko 2 mU/l, a anti TPO At preko 1250 U/ml, pre 20 nedelje gestacije su vrlo indikativni u ovom smislu (69). Ova hipoteza bi se mogla potvrditi brojnim studijama u kojima je supstitucijom levotiroksinom postignuto smanjenje stope gubitaka trudnoće. Treća hipoteza ukazuje da bi TAI mogao biti razlog odložene koncepcije.

Ako se veruje da je endometrijum mesto ekstratiroidne produkcije TH za šta je neophodno prisustvo TPO i Tg, a da se receptori za TH nalaze i na endometrijumu, onda se “otvara put” delovanju anti TPO At i anti Tg At u sprečavanju procesa implantacije, bez direktnog delovanja na jajnu ćeliju i embrion. *In vitro* studije pokazuju da imunizacija Tg-om, vodi nastanku anti Tg At, a u kliničkom smislu do gubitka trudnoće usled porasta stope fetalne apsorpcije, što bi bio ekvivalent spontanom pobačaju u žena, pri čemu je moguće da antitela imaju direktan efekat na placentu (220). Na taj način, imuni odgovor organizma i delovanje tiroidnih autoantitela bi mogli biti “krivci za odbacivanje” embriona nakon ET delovanjem na fetoplacentalnu jedinicu (70) ili odlagati koncepciju stvarajući nepovoljnu sredinu za dalji razvoj embriona.

Žene koje imaju TAI imaju manju šansu da ostvare trudnoću u postupku VTO. Kod naših pacijentkinja, univarijantna analiza je pokazala da šansa da dođe do trudnoće u postupku VTO je oko četiri puta manja ukoliko se radi o TAI da grupi,  $p=0,032$ ,  $OR=0,267$  (95% IP 0,080–0,891). Multivarijantna analiza je pokazala da su pored TAI i progesteron u folikularnoj tečnosti, prethodna VTO i protokol značajni i nezavisni prediktori ishoda VTO. Žene koje imaju TAI shodno ovoj analizi imaju 27,8 puta manju šansu da ostvare trudnoću u postupku VTO, ( $p=0,004$ ,  $OR=0,036$ , 95% IP 0,004–0,347). Takođe, pokazano je da je progesteron u folikularnoj tečnosti nezavisan prediktor ishoda VTO i to što je veći progesteron, veća je šansa da žena u postupku VTO ostane trudna, log progesteron  $p=0,011$ ,  $OR=56,276$  (95% IP 2,542–1245,660). Žene koje su imale prethodnu VTO imaju 12,9 puta manju šansu da ostvare trudnoću,  $p=0,013$ ,  $OR=0,077$  (95% IP 0,010–0,578). Daleko veća šansa da se ostvari trudnoća u postupku VTO je ukoliko se koristi dugi protokol za kontrolisanu ovarijalnu stimulaciju (oko 50 puta),  $p=0,005$ ,  $OR=50,332$  (95% IP 3,235–783,165). Ipak, široki intervali poverenja za OR govore u prilog malog uzorka i ne toliko precizne ocene ovog parametra u populaciji.

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata studije možemo da donesemo sledeće zaključke:

1. Tiroidna autoantitela su prisutna u folikularnoj tečnosti kod pacijentkinja sa pozitivnim tiroidnim autoantitelima u perifernoj krvi. Povišeni nivoi tiroidnih autoantitela u folikularnoj tečnosti žena sa TAI su u snažnoj korelaciji sa vrednostima istih u serumu. Tiroidna autoantitela prisutna u folikularnoj tečnosti se ne generišu u folikularnoj tečnosti, već prolaze krvno-folikularnu barijeru.
2. Prisustvo TAI smanjuje šansu za postizanje trudnoće putem VTO. Po prvi put pokazano je da se vrednosti TSH i  $fT_4$  u folikularnoj tečnosti žena sa i bez TAI ne razlikuju. Takođe, po prvi put smo pokazali prisustvo progesterona u folikularnoj tečnosti žena sa TAI koje su u postupku VTO i procenili njegov uticaj na ishod VTO. Nije bilo statistički značajne razlike srednjih vrednosti progesterona u folikularnoj tečnosti kod žena sa i bez TAI, kao ni značajnih korelacija između progesterona u folikularnoj tečnosti i tiroidnih autoantitela u serumu i folikularnoj tečnosti.
3. Stopa trudnoće po započetom ciklusu i embriotransferu značajno se razlikovala između grupe žena sa i bez TAI, u smislu više stope trudnoće žena koje nemaju TAI. Na osnovu rezultata može se pretpostaviti da TAI nema direktan efekat na oocyte i embrione tokom tretmana VTO, već da je moguće da utiče na postimplantacioni razvoj embriona, smanjujući time šansu za ostvarivanje trudnoće. Naši rezultati ukazuju na nižu stopu uspešnosti VTO u žena sa TAI, naglašavajući time važnost dijagnoze TAI kod žena sa infertilitetom. Pokazano je da su pored TAI, prethodna VTO, progesteron u folikularnoj tečnosti i protokol značajni i nezavisni prediktori ishoda VTO.



## 7. LITERATURA

1. Cooper D, Greenspan F, Ladenson P. The Thyroid Gland. In: Gardner D, Shoback D, editors. Greenspan's Basic and Clinical endocrinology. 8th ed. San Francisco, United States of America: The McGraw-Hill Companies; 2007. p. 210–32.
2. Stavreus Evers A. Paracrine interactions of thyroid hormones and thyroid stimulation hormone in the female reproductive tract have an impact on female fertility. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:50.
3. Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Lindeberg M, Landgren B-M, Sparre LS, Hovatta O. Thyroid-stimulating hormone receptor and thyroid hormone receptors are involved in human endometrial physiology. *Fertil Steril*. 2011 Jan;95(1):230–7, 237-2.
4. Catalano RD, Critchley HO, Heikinheimo O, Baird DT, Hapangama D, Sherwin JRA, et al. Mifepristone induced progesterone withdrawal reveals novel regulatory pathways in human endometrium. *Mol Hum Reprod*. 2007 Sep;13(9):641–54.
5. Aghajanova L, Lindeberg M, Carlsson IB, Stavreus-Evers A, Zhang P, Scott JE, et al. Receptors for thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*. 2009 Mar;18(3):337–47.
6. Zhang SS, Carrillo AJ, Darling DS. Expression of multiple thyroid hormone receptor mRNAs in human oocytes, cumulus cells, and granulosa cells. *Mol Hum Reprod*. 1997 Jul;3(7):555–62.
7. Skjoldebrand Sparre L, Kollind M, Carlstrom K. Ovarian ultrasound and ovarian and adrenal hormones before and after treatment for hyperthyroidism. *Gynecol Obstet Invest*. 2002;54(1):50–5.
8. Ziegelmuller B, Vattai A, Kost B, Kuhn C, Hofmann S, Bayer B, et al. Expression of Thyroid Hormone Receptors in Villous Trophoblasts and Decidual Tissue at Protein and mRNA Levels Is Downregulated in Spontaneous and Recurrent Miscarriages. *J Histochem Cytochem*. 2015 Jul;63(7):511–23.
9. Gonzalez RR, Rueda BR, Ramos MP, Littell RD, Glasser S, Leavis PC. Leptin-induced increase in leukemia inhibitory factor and its receptor by human

- endometrium is partially mediated by interleukin 1 receptor signaling. *Endocrinology*. 2004 Aug;145(8):3850–7.
10. Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, et al. Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology*. 2002 May;143(5):1922–31.
  11. Glinoe D. The regulation of thyroid function in pregnancy: pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology. *Endocr Rev*. 1997 Jun;18(3):404–33.
  12. Glinoe D. Pregnancy and iodine. *Thyroid*. 2001 May;11(5):471–81.
  13. Burns R, Azizi F, Hedayati M, Mirmiran P, O’Herlihy C, Smyth PPA. Is placental iodine content related to dietary iodine intake? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Aug;75(2):261–4.
  14. Andersson M, de Benoist B, Delange F, Zupan J. Prevention and control of iodine deficiency in pregnant and lactating women and in children less than 2-years-old: conclusions and recommendations of the Technical Consultation. *Public Health Nutr*. 2007 Dec;10(12A):1606–11.
  15. Delange F, de Benoist B, Burgi H. Determining median urinary iodine concentration that indicates adequate iodine intake at population level. *Bull World Health Organ*. 2002;80(8):633–6.
  16. Lazarus J. Thyroid Regulation and Dysfunction in the Pregnant Patient. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, et al., editors. South Dartmouth (MA); 2000.
  17. Gomez JM, Maravall FJ, Gomez N, Guma A, Soler J. Determinants of thyroid volume as measured by ultrasonography in healthy adults randomly selected. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000 Nov;53(5):629–34.
  18. Fister P, Gaberscek S, Zaletel K, Krhin B, Gersak K, Hojker S. Thyroid volume and intrathyroidal blood flow increase during pregnancy. Vol. 65, *Clinical endocrinology*. England; 2006. p. 828–9.
  19. Hershman JM. Physiological and pathological aspects of the effect of human chorionic gonadotropin on the thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;18(2):249–65.

20. Ain KB, Mori Y, Refetoff S. Reduced clearance rate of thyroxine-binding globulin (TBG) with increased sialylation: a mechanism for estrogen-induced elevation of serum TBG concentration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987 Oct;65(4):689–96.
21. Fister P, Gaberscek S, Zaletel K, Krhin B, Hojker S, Gersak K. Thyroid function in the third trimester of pregnancy and after delivery in an area of adequate iodine intake. *Int J Gynaecol Obstet.* 2011 Jan;112(1):52–5.
22. Stagnaro-Green A, Abalovich M, Alexander E, Azizi F, Mestman J, Negro R, et al. Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum. *Thyroid.* 2011 Oct;21(10):1081–125.
23. Alexander EK, Pearce EN, Brent GA, Brown RS, Chen H, Dosiou C, et al. 2017 Guidelines of the American Thyroid Association for the Diagnosis and Management of Thyroid Disease During Pregnancy and the Postpartum. *Thyroid.* 2017 Mar;27(3):315–89.
24. Patel J, Landers K, Li H, Mortimer RH, Richard K. Delivery of maternal thyroid hormones to the fetus. *Trends Endocrinol Metab.* 2011 May;22(5):164–70.
25. Burns R, O’Herlihy C, Smyth PPA. Regulation of iodide uptake in placental primary cultures. *Eur Thyroid J.* 2013 Dec;2(4):243–51.
26. Weetman A, DeGroot LJ. Autoimmunity to the Thyroid Gland. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. South Dartmouth (MA); 2000.
27. Vali M, Rose NR, Caturegli P. Thyroglobulin as autoantigen: structure-function relationships. *Rev Endocr Metab Disord.* 2000 Jan;1(1–2):69–77.
28. Latrofa F, Ricci D, Grasso L, Vitti P, Masserini L, Basolo F, et al. Characterization of thyroglobulin epitopes in patients with autoimmune and non-autoimmune thyroid diseases using recombinant human monoclonal thyroglobulin autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Feb;93(2):591–6.
29. Menconi F, Huber A, Osman R, Concepcion E, Jacobson EM, Stefan M, et al. Tg.2098 is a major human thyroglobulin T-cell epitope. *J Autoimmun.* 2010 Aug;35(1):45–51.

30. Saravanan P, Dayan CM. Thyroid autoantibodies. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001 Jun;30(2):315–37, viii.
31. Boyd CM, Baker JRJ. The immunology of thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1996 Mar;25(1):159–79.
32. Rebuffat SA, Nguyen B, Robert B, Castex F, Peraldi-Roux S. Antithyroperoxidase antibody-dependent cytotoxicity in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Mar;93(3):929–34.
33. Chardes T, Chapal N, Bresson D, Bes C, Giudicelli V, Lefranc M-P, et al. The human anti-thyroid peroxidase autoantibody repertoire in Graves' and Hashimoto's autoimmune thyroid diseases. *Immunogenetics.* 2002 Jun;54(3):141–57.
34. McMurray RW, Hoffman RW, Tang H, Braley-Mullen H. T cell receptor V beta usage in murine experimental autoimmune thyroiditis. *Cell Immunol.* 1996 Aug;172(1):1–9.
35. Ehlers M, Thiel A, Bernecker C, Porwol D, Papewalis C, Willenberg HS, et al. Evidence of a combined cytotoxic thyroglobulin and thyroperoxidase epitope-specific cellular immunity in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Apr;97(4):1347–54.
36. Weetman AP, Ajjan RA, Watson PF. Cytokines and Graves' disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1997 Oct;11(3):481–97.
37. Weetman AP. The immunopathogenesis of chronic autoimmune thyroiditis one century after hashimoto. *Eur Thyroid J.* 2013 Jan;1(4):243–50.
38. Chiovato L, Bassi P, Santini F, Mammoli C, Lapi P, Carayon P, et al. Antibodies producing complement-mediated thyroid cytotoxicity in patients with atrophic or goitrous autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Dec;77(6):1700–5.
39. Metcalfe RA, Oh YS, Stroud C, Arnold K, Weetman AP. Analysis of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity.* 1997;25(2):65–72.
40. Akamizu T, Amino N, DeGroot LJ. Hashimoto's Thyroiditis. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. South Dartmouth (MA); 2000.

41. Jameson JL. Endocrinology and Metabolism. In: Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19th ed. New York, United States: McGraw-Hill Education; 2015. p. 2289–93.
42. Medenica S, Radojevic N, Stojkovic M, Nedeljkovic-Beleslin B, Savic S, Ciric J, et al. Autoimmunity and thyrotropin level in developing thyroid malignancy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015 Aug;19(15):2824–9.
43. Hashimoto K, Mori M. [Guidelines for the diagnosis and management of thyroid disease and their utility]. *Nihon Rinsho*. 2012 Nov;70(11):1857–64.
44. Wiersinga WM, Duntas L, Fadeyev V, Nygaard B, Vanderpump MPJ. 2012 ETA Guidelines: The Use of L-T4 + L-T3 in the Treatment of Hypothyroidism. *Eur Thyroid J*. 2012 Jul;1(2):55–71.
45. Duntas LH. The Role of Iodine and Selenium in Autoimmune Thyroiditis. *Horm Metab Res*. 2015 Sep;47(10):721–6.
46. Poppe K, Velkeniers B. Thyroid and infertility. *Verh K Acad Geneeskd Belg*. 2002;64(6):382–9.
47. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). *Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems*. London; 2013.
48. Weiss RV, Clapauch R. Female infertility of endocrine origin. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014 Mar;58(2):144–52.
49. World Health Organization 2013. *Sexual and reproductive health: Infertility definitions and terminology*.
50. Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013 Jul;31(19):2500–10.
51. Group ECW. Diagnosis and management of the infertile couple: missing information. *Hum Reprod Update*. 2004;10(4):295–307.
52. Cho MK. Thyroid dysfunction and subfertility. *Clin Exp Reprod Med*. 2015 Dec;42(4):131–5.

53. Cervera R, Balasch J. Bidirectional effects on autoimmunity and reproduction. *Hum Reprod Update*. 2008;14(4):359–66.
54. Kim NY, Cho HJ, Kim HY, Yang KM, Ahn HK, Thornton S, et al. Thyroid autoimmunity and its association with cellular and humoral immunity in women with reproductive failures. *Am J Reprod Immunol*. 2011 Jan;65(1):78–87.
55. Huang C, Liang P, Diao L, Liu C, Chen X, Li G, et al. Thyroid Autoimmunity is Associated with Decreased Cytotoxicity T Cells in Women with Repeated Implantation Failure. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Sep;12(9):10352–61.
56. Twig G, Shina A, Amital H, Shoenfeld Y. Pathogenesis of infertility and recurrent pregnancy loss in thyroid autoimmunity. *J Autoimmun*. 2012 May;38(2–3):J275-81.
57. Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update*. 2009;15(5):517–35.
58. Glick AB, Wodzinski A, Fu P, Levine AD, Wald DN. Impairment of regulatory T-cell function in autoimmune thyroid disease. *Thyroid*. 2013 Jul;23(7):871–8.
59. Dosiou C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev*. 2005 Feb;26(1):44–62.
60. Farghali MM, El-Kholy A-LG, Swidan KH, Abdelazim IA, Rashed AR, El-Sobky E, et al. Relationship between uterine natural killer cells and unexplained repeated miscarriage. *J Turkish Ger Gynecol Assoc*. 2015;16(4):214–8.
61. Mariee NG, Tuckerman E, Laird S, Li TC. The correlation of autoantibodies and uNK cells in women with reproductive failure. *J Reprod Immunol*. 2012 Sep;95(1–2):59–66.
62. Glinoeer D, Riahi M, Grun JP, Kinthaert J. Risk of subclinical hypothyroidism in pregnant women with asymptomatic autoimmune thyroid disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Jul;79(1):197–204.
63. Negro R, Formoso G, Mangieri T, Pezzarossa A, Dazzi D, Hassan H. Levothyroxine treatment in euthyroid pregnant women with autoimmune thyroid disease: effects on obstetrical complications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Jul;91(7):2587–91.

64. Wilson C, Elstein M, Eade OE, Lloyd R, Wright R. Smooth-muscle antibodies in infertility. *Lancet* (London, England). 1975 Dec;2(7947):1238–9.
65. Stagnaro-Green A, Roman SH, Cobin RH, el-Harazy E, Alvarez-Marfany M, Davies TF. Detection of at-risk pregnancy by means of highly sensitive assays for thyroid autoantibodies. *JAMA*. 1990 Sep;264(11):1422–5.
66. Kutteh WH, Yetman DL, Carr AC, Beck LA, Scott RTJ. Increased prevalence of antithyroid antibodies identified in women with recurrent pregnancy loss but not in women undergoing assisted reproduction. *Fertil Steril*. 1999 May;71(5):843–8.
67. Reimand K, Talja I, Metskula K, Kadastik U, Matt K, Uibo R. Autoantibody studies of female patients with reproductive failure. *J Reprod Immunol*. 2001 Aug;51(2):167–76.
68. Poppe K, Glinoe D, Van Steirteghem A, Tournaye H, Devroey P, Schiettecatte J, et al. Thyroid dysfunction and autoimmunity in infertile women. *Thyroid*. 2002 Nov;12(11):997–1001.
69. Poppe K, Glinoe D. Thyroid autoimmunity and hypothyroidism before and during pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2003;9(2):149–61.
70. Kaprara A, Krassas GE. Thyroid autoimmunity and miscarriage. *Hormones* (Athens). 2008;7(4):294–302.
71. Krassas GE, Poppe K, Glinoe D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocr Rev*. 2010 Oct;31(5):702–55.
72. Ticconi C, Giuliani E, Veglia M, Pietropoli A, Piccione E, Di Simone N. Thyroid autoimmunity and recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. 2011 Dec;66(6):452–9.
73. Lin C, Xiang Y, Li J. The contribution of thyroid autoimmunity to miscarriage in euthyroid women. *Minerva Med*. 2016 Jun;107(3):173–81.
74. Cleary-Goldman J, Malone FD, Lambert-Messerlian G, Sullivan L, Canick J, Porter TF, et al. Maternal thyroid hypofunction and pregnancy outcome. *Obstet Gynecol*. 2008 Jul;112(1):85–92.
75. Prummel MF, Wiersinga WM. Thyroid autoimmunity and miscarriage. *Eur J Endocrinol*. 2004 Jun;150(6):751–5.

76. Marzullo P, Minocci A, Tagliaferri MA, Guzzaloni G, Di Blasio A, De Medici C, et al. Investigations of thyroid hormones and antibodies in obesity: leptin levels are associated with thyroid autoimmunity independent of bioanthropometric, hormonal, and weight-related determinants. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Aug;95(8):3965–72.
77. Toulis KA, Goulis DG, Venetis CA, Kolibianakis EM, Negro R, Tarlatzis BC, et al. Risk of spontaneous miscarriage in euthyroid women with thyroid autoimmunity undergoing IVF: a meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2010 Apr;162(4):643–52.
78. De Groot L, Abalovich M, Alexander EK, Amino N, Barbour L, Cobin RH, et al. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Aug;97(8):2543–65.
79. Vissenberg R, van den Boogaard E, van Wely M, van der Post JA, Fliers E, Bisschop PH, et al. Treatment of thyroid disorders before conception and in early pregnancy: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2012 Jul;18(4):360–73.
80. Yan J, Sripada S, Saravelos SH, Chen Z-J, Egner W, Li T-C. Thyroid peroxidase antibody in women with unexplained recurrent miscarriage: prevalence, prognostic value, and response to empirical thyroxine therapy. *Fertil Steril.* 2012 Aug;98(2):378–82.
81. Thangaratinam S, Tan A, Knox E, Kilby MD, Franklyn J, Coomarasamy A. Association between thyroid autoantibodies and miscarriage and preterm birth: meta-analysis of evidence. *BMJ.* 2011;342:d2616.
82. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Subclinical hypothyroidism in the infertile female population: a guideline. *Fertil Steril.* 2015 Sep;104(3):545–53.
83. Ando T, Davies TF. Self-recognition and the role of fetal microchimerism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;18(2):197–211.
84. Singla R, Gupta Y, Khemani M, Aggarwal S. Thyroid disorders and polycystic ovary syndrome: An emerging relationship. *Indian J Endocrinol Metab.* 2015;19(1):25–9.



85. Arduc A, Aycicek Dogan B, Bilmez S, Imga Nasiroglu N, Tuna MM, Isik S, et al. High prevalence of Hashimoto's thyroiditis in patients with polycystic ovary syndrome: does the imbalance between estradiol and progesterone play a role? *Endocr Res.* 2015;40(4):204–10.
86. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004 Jan;81(1):19–25.
87. Beruchashvili M, Gogiashvili L, Tsagareli Z, Topuriya Z. [Morphology of the reproductive age women cervical epithelium under hypothyreosis]. *Georgian Med News.* 2013 Jan;(214):62–7.
88. van den Boogaard E, Vissenberg R, Land JA, van Wely M, van der Post JAM, Goddijn M, et al. Significance of (sub)clinical thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity before conception and in early pregnancy: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2011;17(5):605–19.
89. Grassi G, Balsamo A, Ansaldi C, Balbo A, Massobrio M, Benedetto C. Thyroid autoimmunity and infertility. *Gynecol Endocrinol.* 2001 Oct;15(5):389–96.
90. Benhadi N, Wiersinga WM, Reitsma JB, Vrijkotte TGM, Bonsel GJ. Higher maternal TSH levels in pregnancy are associated with increased risk for miscarriage, fetal or neonatal death. *Eur J Endocrinol.* 2009 Jun;160(6):985–91.
91. Negro R, Schwartz A, Gismondi R, Tinelli A, Mangieri T, Stagnaro-Green A. Universal screening versus case finding for detection and treatment of thyroid hormonal dysfunction during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Apr;95(4):1699–707.
92. Casey BM, Dashe JS, Wells CE, McIntire DD, Byrd W, Leveno KJ, et al. Subclinical hypothyroidism and pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol.* 2005 Feb;105(2):239–45.
93. Mannisto T, Mendola P, Grewal J, Xie Y, Chen Z, Laughon SK. Thyroid diseases and adverse pregnancy outcomes in a contemporary US cohort. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Jul;98(7):2725–33.
94. Medici M, Timmermans S, Visser W, de Muinck Keizer-Schrama SMPF, Jaddoe VWW, Hofman A, et al. Maternal thyroid hormone parameters during early pregnancy and birth weight: the Generation R Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Jan;98(1):59–66.

95. Maraka S, Ospina NMS, O’Keeffe DT, Espinosa De Ycaza AE, Gionfriddo MR, Erwin PJ, et al. Subclinical Hypothyroidism in Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thyroid*. 2016 Apr;26(4):580–90.
96. Moog NK, Entringer S, Heim C, Wadhwa PD, Kathmann N, Buss C. Influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development. *Neuroscience*. 2017 Feb 7;342:68-100.
97. Saglam F, Onal ED, Ersoy R, Koca C, Ergin M, Erel O, et al. Anti-Mullerian hormone as a marker of premature ovarian aging in autoimmune thyroid disease. *Gynecol Endocrinol*. 2015 Feb;31(2):165–8.
98. Kuroda K, Uchida T, Nagai S, Ozaki R, Yamaguchi T, Sato Y, et al. Elevated serum thyroid-stimulating hormone is associated with decreased anti-Mullerian hormone in infertile women of reproductive age. *J Assist Reprod Genet*. 2015 Feb;32(2):243–7.
99. Taylor PN, Minassian C, Rehman A, Iqbal A, Draman MS, Hamilton W, et al. TSH levels and risk of miscarriage in women on long-term levothyroxine: a community-based study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Oct;99(10):3895–902.
100. Abalovich M, Mitelberg L, Allami C, Gutierrez S, Alcaraz G, Otero P, et al. Subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity in women with infertility. *Gynecol Endocrinol*. 2007 May;23(5):279–83.
101. Verma I, Sood R, Juneja S, Kaur S. Prevalence of hypothyroidism in infertile women and evaluation of response of treatment for hypothyroidism on infertility. *Int J Appl basic Med Res*. 2012 Jan;2(1):17–9.
102. Raber W, Nowotny P, Vytiska-Binstorfer E, Vierhapper H. Thyroxine treatment modified in infertile women according to thyroxine-releasing hormone testing: 5 year follow-up of 283 women referred after exclusion of absolute causes of infertility. *Hum Reprod*. 2003 Apr;18(4):707–14.
103. Yang J, Guo H, Ding S, Tao B, Zhang X. [Effect of the treatment acceptance on the perinatal outcomes in women with subclinical hypothyroidism, positive thyroid gland peroxidase antibody in early pregnancy]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2015 Sep;50(9):652–7.
104. Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*. 1994 Feb;50(2):225–32.

105. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:40.
106. Baskind NE, McRae C, Sharma V, Fisher J. Understanding subfertility at a molecular level in the female through the application of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Hum Reprod Update*. 2011;17(2):228–41.
107. Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*. 2015 Feb;103(2):303–16.
108. Leroy JLMR, Rizos D, Sturmey R, Bossaert P, Gutierrez-Adan A, Van Hoeck V, et al. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: a focus on dairy cow fertility. *Reprod Fertil Dev*. 2011;24(1):1–12.
109. Wang T-H, Chang C-L, Wu H-M, Chiu Y-M, Chen C-K, Wang H-S. Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fertil Steril*. 2006 Nov;86(5):1392–401.
110. De Placido G, Alviggi C, Clarizia R, Mollo A, Alviggi E, Strina I, et al. Intrafollicular leptin concentration as a predictive factor for in vitro oocyte fertilization in assisted reproductive techniques. *J Endocrinol Invest*. 2006 Sep;29(8):719–26.
111. Tokuyama O, Nakamura Y, Muso A, Fujino Y, Ishiko O, Ogita S. Vascular endothelial growth factor concentrations in follicular fluid obtained from IVF-ET patients: a comparison of hMG, clomiphene citrate, and natural cycle. *J Assist Reprod Genet*. 2002 Jan;19(1):19–23.
112. Nishimoto T, Mori T, Yamada I, Nishimura T. Autoantibodies to zona pellucida in infertile and aged women. *Fertil Steril*. 1980 Dec;34(6):552–6.
113. Ulcova-Gallova Z, Babcova K, Novakova P, Micanova Z, Rokyta Z. [Antizonal antibodies in ovulatory cervical mucus and in serum of patients with fertility disorders]. *Ceska Gynekol*. 2004 May;69(3):215–8.

114. Kamada M, Daitoh T, Mori K, Maeda N, Hirano K, Irahara M, et al. Etiological implication of autoantibodies to zona pellucida in human female infertility. *Am J Reprod Immunol.* 1992 Sep;28(2):104–9.
115. Arefi S, Tehrani MJ, Akhondi MM, Mousavi AR, Heidari M, Bayat AA, et al. Anti-zona pellucida antibodies in infertile patients in relation to multiple puncture of ovaries and unexplained infertility. *Iran J Reprod Med.* 2005;3(1):30–5.
116. Caccavo D, Pellegrino NM, Nardelli C, Vergine S, Leone L, Marolla A, et al. Anti-laminin-1 antibodies in serum and follicular fluid of women with Hashimoto's thyroiditis undergoing in vitro fertilization. Vol. 29, *International journal of immunopathology and pharmacology.* England; 2016. p. 280–7.
117. Nardo LG, Chouliaras S. Progestogens and recurrent miscarriage. In: Howard J.A. Carp, editor. *Progestogens in Obstetrics and Gynecology.* 1st ed. Switzerland: Springer International Publishing; 2015. p. 65–79.
118. Liu L, Zhou F, Lin X, Li T, Tong X, Zhu H, et al. Recurrent IVF failure is associated with elevated progesterone on the day of hCG administration. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 Nov;171(1):78–83.
119. Bussen S, Steck T, Dietl J. Increased prevalence of thyroid antibodies in euthyroid women with a history of recurrent in-vitro fertilization failure. *2000;15(3):545–8.*
120. Vissenberg R, Manders VD, Mastenbroek S, Fliers E, Afink GB, Ris-Stalpers C, et al. Pathophysiological aspects of thyroid hormone disorders/thyroid peroxidase autoantibodies and reproduction. *Hum Reprod Update.* 2015;21(3):378–87.
121. Zhong Y, Ying Y, Wu H, Zhou C, Xu Y, Wang Q, et al. Relationship between antithyroid antibody and pregnancy outcome following in vitro fertilization and embryo transfer. *Int J Med Sci.* 2012;9(2):121–5.
122. Poppe K, Glinoeer D, Tournaye H, Devroey P, van Steirteghem A, Kaufman L, et al. Assisted reproduction and thyroid autoimmunity: an unfortunate combination? *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Sep;88(9):4149–52.
123. Feldthusen A-D, Pedersen PL, Larsen J, Toft Kristensen T, Ellervik C, Kvetny J. Impaired Fertility Associated with Subclinical Hypothyroidism and Thyroid Autoimmunity: The Danish General Suburban Population Study. *J Pregnancy.* 2015;2015:132718.

124. Negro R, Formoso G, Coppola L, Presicce G, Mangieri T, Pezzarossa A, et al. Euthyroid women with autoimmune disease undergoing assisted reproduction technologies: the role of autoimmunity and thyroid function. *J Endocrinol Invest.* 2007 Jan;30(1):3–8.
125. Wu H, Hong T, Gao H, Wang H. [Effects of thyroid autoimmunity on pregnancy outcomes in euthyroid women receiving in vitro fertilization: a meta-analysis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2015 Dec;95(46):3770–4.
126. He H, Jing S, Gong F, Tan YQ, Lu GX, Lin G. Effect of thyroid autoimmunity per se on assisted reproduction treatment outcomes: A meta-analysis. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2016 Apr;55(2):159–65.
127. Busnelli A, Somigliana E, Ferrari S, Filippi F, Vannucchi G, Fugazzola L, et al. THE LONG-TERM IMPACT OF CONTROLLED OVARIAN HYPERSTIMULATION ON THYROID FUNCTION. *Endocr Pract.* 2016 Apr;22(4):389–95.
128. Poppe K, Glinoeer D, Tournaye H, Schiettecatte J, Devroey P, van Steirteghem A, et al. Impact of ovarian hyperstimulation on thyroid function in women with and without thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Aug;89(8):3808–12.
129. Del Ghianda S, Loconte E, Ruggiero M, Benelli E, Artini PG, Cela V, et al. Over hypothyroidism in a woman undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Endocr Pract.* 2014 Jan;20(1):e11–3.
130. Muller AF, Verhoeff A, Mantel MJ, De Jong FH, Berghout A. Decrease of free thyroxine levels after controlled ovarian hyperstimulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Feb;85(2):545–8.
131. Busnelli A, Somigliana E, Benaglia L, Sarais V, Ragni G, Fedele L. Thyroid axis dysregulation during in vitro fertilization in hypothyroid-treated patients. *Thyroid.* 2014 Nov;24(11):1650–5.
132. Poppe K, Unuane D, D’Haeseleer M, Tournaye H, Schiettecatte J, Haentjens P, et al. Thyroid function after controlled ovarian hyperstimulation in women with and without the hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 2011 Jul;96(1):241–5.
133. Gracia CR, Morse CB, Chan G, Schilling S, Prewitt M, Sammel MD, et al. Thyroid function during controlled ovarian hyperstimulation as part of in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2012 Mar;97(3):585–91.

134. Magri F, Capelli V, Gaiti M, Brambilla E, Montesion L, Rotondi M, et al. Impaired outcome of controlled ovarian hyperstimulation in women with thyroid autoimmune disease. *Thyroid*. 2013 Oct;23(10):1312–8.
135. Tan S, Dieterle S, Pechlavanis S, Janssen OE, Fuhrer D. Thyroid autoantibodies per se do not impair intracytoplasmic sperm injection outcome in euthyroid healthy women. *Eur J Endocrinol*. 2014 Apr;170(4):495–500.
136. Kutteh WH, Schoolcraft WB, Scott RTJ. Antithyroid antibodies do not affect pregnancy outcome in women undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod*. 1999 Nov;14(11):2886–90.
137. Lukaszuk K, Kunicki M, Kulwikowska P, Liss J, Pastuszek E, Jaszczolt M, et al. The impact of the presence of antithyroid antibodies on pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection-ICSI and embryo transfer in women with normal thyreotropine levels. *J Endocrinol Invest*. 2015 Dec;38(12):1335–43.
138. Unuane D, Velkeniers B, Deridder S, Bravenboer B, Tournaye H, De Brucker M. Impact of thyroid autoimmunity on cumulative delivery rates in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril*. 2016 Jul;106(1):144–50.
139. Mintziori G, Goulis DG, Gialamas E, Dosopoulos K, Zouzoulas D, Gitas G, et al. Association of TSH concentrations and thyroid autoimmunity with IVF outcome in women with TSH concentrations within normal adult range. *Gynecol Obstet Invest*. 2014;77(2):84–8.
140. Chai J, Yeung W-YT, Lee C-Y V, Li H-WR, Ho P-C, Ng H-YE. Live birth rates following in vitro fertilization in women with thyroid autoimmunity and/or subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014 Jan;80(1):122–7.
141. Cohen SB, Goldenberg M, Rabinovici J, Lidor AL, Dulitzky M, Gilburd B, et al. Anti-cardiolipin antibodies in fetal blood and amniotic fluid derived from patients with the anti-phospholipid syndrome. *Hum Reprod*. 2000 May;15(5):1170–2.
142. Kutteh WH, Rote NS, Silver R. Antiphospholipid antibodies and reproduction: the antiphospholipid antibody syndrome. *Am J Reprod Immunol*. 1999 Feb;41(2):133–52.

143. Ott J, Aust S, Kurz C, Nouri K, Wirth S, Huber JC, et al. Elevated antithyroid peroxidase antibodies indicating Hashimoto's thyroiditis are associated with the treatment response in infertile women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2010 Dec;94(7):2895–7.
144. Sher G, Maassarani G, Zouves C, Feinman M, Sohn S, Matzner W, et al. The use of combined heparin/aspirin and immunoglobulin G therapy in the treatment of in vitro fertilization patients with antithyroid antibodies. *Am J Reprod Immunol*. 1998 Apr;39(4):223–5.
145. Litwicka K, Arrivi C, Varricchio MT, Mencacci C, Greco E. In women with thyroid autoimmunity, does low-dose prednisolone administration, compared with no adjuvant therapy, improve in vitro fertilization clinical results? *J Obstet Gynaecol Res*. 2015 May;41(5):722–8.
146. Revelli A, Casano S, Piane LD, Grassi G, Gennarelli G, Guidetti D, et al. A retrospective study on IVF outcome in euthyroid patients with anti-thyroid antibodies: effects of levothyroxine, acetyl-salicylic acid and prednisolone adjuvant treatments. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:137.
147. Negro R, Mangieri T, Coppola L, Presicce G, Casavola EC, Gismondi R, et al. Levothyroxine treatment in thyroid peroxidase antibody-positive women undergoing assisted reproduction technologies: a prospective study. *Hum Reprod*. 2005 Jun;20(6):1529–33.
148. Scoccia B, Demir H, Kang Y, Fierro MA, Winston NJ. In vitro fertilization pregnancy rates in levothyroxine-treated women with hypothyroidism compared to women without thyroid dysfunction disorders. *Thyroid*. 2012 Jun;22(6):631–6.
149. Busnelli A, Vannucchi G, Paffoni A, Faulisi S, Fugazzola L, Fedele L, et al. Levothyroxine dose adjustment in hypothyroid women achieving pregnancy through IVF. *Eur J Endocrinol*. 2015 Oct;173(4):417–24.
150. Busnelli A, Somigliana E, Benaglia L, Leonardi M, Ragni G, Fedele L. In vitro fertilization outcomes in treated hypothyroidism. *Thyroid*. 2013 Oct;23(10):1319–25.
151. Lin L, Zhang XL, Long Y. Analysis of thyroid peroxidase antibody in early pregnancy. *Genet Mol Res*. 2014;13(3):5107–14.

152. Allan WC, Haddow JE, Palomaki GE, Williams JR, Mitchell ML, Hermos RJ, et al. Maternal thyroid deficiency and pregnancy complications: implications for population screening. *J Med Screen*. 2000;7(3):127–30.
153. Amouzegar A, Mehran L, Sarvghadi F, Delshad H, Azizi F, Lazarus JH. Comparison of the American Thyroid Association with the Endocrine Society practice guidelines for the screening and treatment of hypothyroidism during pregnancy. *Hormones (Athens)*. 2014;13(3):307–13.
154. Nazarpour S, Tehrani FR, Simbar M, Tohidi M, AlaviMajd H, Azizi F. Comparison of universal screening with targeted high-risk case finding for diagnosis of thyroid disorders. *Eur J Endocrinol*. 2016 Jan;174(1):77–83.
155. Danese MD, Powe NR, Sawin CT, Ladenson PW. Screening for mild thyroid failure at the periodic health examination: a decision and cost-effectiveness analysis. *JAMA*. 1996 Jul;276(4):285–92.
156. Lazarus JH, Bestwick JP, Channon S, Paradice R, Maina A, Rees R, et al. Antenatal thyroid screening and childhood cognitive function. *N Engl J Med*. 2012 Feb;366(6):493–501.
157. Vaidya B, Anthony S, Bilous M, Shields B, Drury J, Hutchison S, et al. Detection of thyroid dysfunction in early pregnancy: Universal screening or targeted high-risk case finding? *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jan;92(1):203–7.
158. Bogner U, Hegedus L, Hansen JM, Finke R, Schleusener H. Thyroid cytotoxic antibodies in atrophic and goitrous autoimmune thyroiditis. *Eur J Endocrinol*. 1995 Jan;132(1):69–74.
159. Zarkovic M, Ciric J, Beleslin B, Ciric S, Bulat P, Topalov D, et al. Further studies on delineating thyroid-stimulating hormone (TSH) reference range. *Horm Metab Res*. 2011 Dec;43(13):970–6.
160. Demidenko E. Sample size determination for logistic regression revisited. *Stat Med*. 2007 Aug;26(18):3385–97.
161. Chen L, Hu R. Thyroid autoimmunity and miscarriage: a meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Apr;74(4):513–9.
162. Abbassi-Ghanavati M, Casey BM, Spong CY, McIntire DD, Halvorson LM, Cunningham FG. Pregnancy outcomes in women with thyroid peroxidase antibodies. *Obstet Gynecol*. 2010 Aug;116(2 Pt 1):381–6.



163. Quintino-Moro A, Zantut-Wittmann DE, Tambascia M, Machado H da C, Fernandes A. High Prevalence of Infertility among Women with Graves' Disease and Hashimoto's Thyroiditis. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:982705.
164. Sakar MN, Unal A, Atay AE, Zebitay AG, Verit FF, Demir S, et al. Is there an effect of thyroid autoimmunity on the outcomes of assisted reproduction? *J Obstet Gynaecol*. 2016;36(2):213–7.
165. Ceylan I, Yener S, Bayraktar F, Secil M. Roles of ultrasound and power Doppler ultrasound for diagnosis of Hashimoto thyroiditis in anti-thyroid marker-positive euthyroid subjects. *Quant Imaging Med Surg*. 2014 Aug;4(4):232–8.
166. Liu Y, Huang H, Zeng J, Sun C. Thyroid volume, goiter prevalence, and selenium levels in an iodine-sufficient area: a cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2013 Dec;13:1153.
167. Sahin E, Elboga U, Kalender E. Regional reference values of thyroid gland volume in Turkish Adults. *Srp Arh Celok Lek*. 2015;143(3–4):141–5.
168. Petrikova J, Lazurova I, Dravecka I, Vrbikova J, Kozakova D, Figurova J, et al. The prevalence of non organ specific and thyroid autoimmunity in patients with polycystic ovary syndrome. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2015 Jun;159(2):302–6.
169. Janssen OE, Mehlmauer N, Hahn S, Offner AH, Gartner R. High prevalence of autoimmune thyroiditis in patients with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2004 Mar;150(3):363–9.
170. Du D, Li X. The relationship between thyroiditis and polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2013;6(10):880–9.
171. Gaberscek S, Zaletel K, Schwetz V, Pieber T, Obermayer-Pietsch B, Lerchbaum E. Mechanisms in endocrinology: thyroid and polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2015 Jan;172(1):R9-21.
172. Boomsma CM, Eijkemans MJC, Hughes EG, Visser GHA, Fauser BCJM, Macklon NS. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6):673–83.
173. Petta CA, Arruda MS, Zantut-Wittmann DE, Benetti-Pinto CL. Thyroid autoimmunity and thyroid dysfunction in women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2007 Oct;22(10):2693–7.

174. Kim C-H, Ahn J-W, Kang SP, Kim S-H, Chae H-D, Kang B-M. Effect of levothyroxine treatment on in vitro fertilization and pregnancy outcome in infertile women with subclinical hypothyroidism undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2011 Apr;95(5):1650–4.
175. Foroozanfard F, Moraveji SA, Taghavi SA, Karimi F. Association Between Serum Estradiol Level on the Day of hCG Administration and IVF-ICSI Outcome. *J Obstet Gynaecol India*. 2016 Jun;66(3):170–3.
176. Wei M, Zhang XM, Gu FL, Lv F, Ji YR, Liu KF, et al. The impact of LH, E2, and P level of HCG administration day on outcomes of in vitro fertilization in controlled ovarian hyperstimulation. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2015;42(3):361–6.
177. Wang M, Hao C, Bao H, Huang X, Liu Z, Zhang W, et al. Effect of elevated estradiol levels on the hCG administration day on IVF pregnancy and birth outcomes in the long GnRH-agonist protocol: analysis of 3393 cycles. *Arch Gynecol Obstet*. 2017 Feb;295(2):407-414.
178. Erzincan SG, Esmer AC, Baysal B. Does the estradiol level on the day of human chorionic gonadotropin administration predict the clinical outcome of controlled ovarian hyperstimulation? *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2014;41(6):709–12.
179. Busnelli A, Paffoni A, Fedele L, Somigliana E. The impact of thyroid autoimmunity on IVF/ICSI outcome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2016 Nov;22(6):793–4.
180. Sowinski J, Sawicka-Gutaj N, Gutaj P, Ruchala M. The role of free triiodothyronine in pathogenesis of infertility in levothyroxine-treated women with thyroid autoimmunity - a preliminary observational study. *Gynecol Endocrinol*. 2015 Feb;31(2):116–8.
181. Monteleone P, Parrini D, Faviana P, Carletti E, Casarosa E, Uccelli A, et al. Female infertility related to thyroid autoimmunity: the ovarian follicle hypothesis. *Am J Reprod Immunol*. 2011 Aug;66(2):108–14.
182. De Silva M. Detection and measurement of thyroid stimulating hormone in human follicular fluid. *J Reprod Med*. 1994 Sep;39(9):679–80.

183. Wakim AN, Polizotto SL, Buffo MJ, Marrero MA, Burholt DR. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertil Steril*. 1993 Jun;59(6):1187–90.
184. Cedikova M, Babuska V, Rajdl D, Zech NH, Kalis V, Kralickova M. [Comparison of prolactin, free T3 and free T4 levels in the follicular fluid of infertile women and healthy fertile oocyte donors]. *Ces Gynecol*. 2012 Oct;77(5):471–6.
185. Wen X, Li D, Tozer AJ, Docherty SM, Iles RK. Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010 Oct;8:117.
186. Mendoza C, Cremades N, Ruiz-Requena E, Martinez F, Ortega E, Bernabeu S, et al. Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. *Hum Reprod*. 1999 Mar;14(3):628–35.
187. Pacella L, Zander-Fox DL, Armstrong DT, Lane M. Women with reduced ovarian reserve or advanced maternal age have an altered follicular environment. *Fertil Steril*. 2012 Oct;98(4):982–6.
188. Shanker YG, Sharma SC, Rao AJ. Expression of progesterone receptor mRNA in the first trimester human placenta. *Biochem Mol Biol Int*. 1997 Sep;42(6):1235–40.
189. Carpintero NL, Suarez OA, Mangas CC, Varea CG, Rioja RG. Follicular steroid hormones as markers of oocyte quality and oocyte development potential. *J Hum Reprod Sci*. 2014 Jul;7(3):187–93.
190. Basuray R, Rawlins RG, Radwanska E, Henig I, Sachdeva S, Tummon I, et al. High progesterone/estradiol ratio in follicular fluid at oocyte aspiration for in vitro fertilization as a predictor of possible pregnancy. *Fertil Steril*. 1988 Jun;49(6):1007–11.
191. Enien WM, el Sahwy S, Harris CP, Seif MW, Elstein M. Human chorionic gonadotrophin and steroid concentrations in follicular fluid: the relationship to oocyte maturity and fertilization rates in stimulated and natural in-vitro fertilization cycles. *Hum Reprod*. 1995 Nov;10(11):2840–4.

192. Kobayashi T, Oda T, Yoshimura Y, Takehara Y, Natori M, Nozawa S. Androstenedione and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid correlate with successful fertilization and cleavage of human oocytes in vitro. *Fertil Steril*. 1991 Aug;56(2):301–5.
193. Vanluchene E, Hinting A, Dhont M, De Sutter P, Van Maele G, Vandekerckhove D. Follicular fluid steroid levels in relation to oocyte maturity and in vitro fertilization. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991 Jan;38(1):83–7.
194. Kreiner D, Liu HC, Itskovitz J, Veeck L, Rosenwaks Z. Follicular fluid estradiol and progesterone are markers of preovulatory oocyte quality. *Fertil Steril*. 1987 Dec;48(6):991–4.
195. Asimakopoulos B, Abu-Hassan D, Metzen E, Al-Hasani S, Diedrich K, Nikolettos N. The levels of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2008 Jul;90(1):60–4.
196. Kelkar RL, Meherji PK, Kadam SS, Gupta SK, Nandedkar TD. Circulating auto-antibodies against the zona pellucida and thyroid microsomal antigen in women with premature ovarian failure. *J Reprod Immunol*. 2005 Jun;66(1):53–67.
197. Kim CH, Chae HD, Kang BM, Chang YS. Influence of antithyroid antibodies in euthyroid women on in vitro fertilization-embryo transfer outcome. *Am J Reprod Immunol*. 1998 Jul;40(1):2–8.
198. Lee YL, Ng HP, Lau KS, Liu WM, O WS, Yeung WSB, et al. Increased fetal abortion rate in autoimmune thyroid disease is related to circulating TPO autoantibodies in an autoimmune thyroiditis animal model. *Fertil Steril*. 2009 May;91(5 Suppl):2104–9.
199. Sieiro Netto L, Medina Coeli C, Micmacher E, Mamede Da Costa S, Nazar L, Galvao D, et al. Influence of thyroid autoimmunity and maternal age on the risk of miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. 2004 Nov;52(5):312–6.
200. Todorova K, Genova M, Konova E. [Frequency of miscarriages among pregnant women with autoimmune thyroid disorders]. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2008;47(2):16–20.
201. Pratt DE, Kaberlein G, Dudkiewicz A, Karande V, Gleicher N. The association of antithyroid antibodies in euthyroid nonpregnant women with recurrent first trimester abortions in the next pregnancy. *Fertil Steril*. 1993 Dec;60(6):1001–5.

202. Sezer K, Kamel N, Unlu C, Celik HK. Impact of first trimester and postpartum period thyroid autoantibodies on abortus incidence in Turkish pregnant women. *Gynecol Endocrinol*. 2009 Jun;25(6):387–91.
203. He X, Wang P, Wang Z, He X, Xu D, Wang B. Thyroid antibodies and risk of preterm delivery: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Endocrinol*. 2012 Oct;167(4):455–64.
204. Ghassabian A, Bongers-Schokking JJ, de Rijke YB, van Mil N, Jaddoe VW V, de Muinck Keizer-Schrama SMPF, et al. Maternal thyroid autoimmunity during pregnancy and the risk of attention deficit/hyperactivity problems in children: the Generation R Study. *Thyroid*. 2012 Feb;22(2):178–86.
205. Mannisto T, Vaarasmaki M, Pouta A, Hartikainen A-L, Ruokonen A, Surcel H-M, et al. Perinatal outcome of children born to mothers with thyroid dysfunction or antibodies: a prospective population-based cohort study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Mar;94(3):772–9.
206. Negro R, Schwartz A, Gismondi R, Tinelli A, Mangieri T, Stagnaro-Green A. Thyroid antibody positivity in the first trimester of pregnancy is associated with negative pregnancy outcomes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jun;96(6):E920–4.
207. Li Y, Shan Z, Teng W, Yu X, Li Y, Fan C, et al. Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25-30 months. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010 Jun;72(6):825–9.
208. Haddow JE, Cleary-Goldman J, McClain MR, Palomaki GE, Neveux LM, Lambert-Messerlian G, et al. Thyroperoxidase and thyroglobulin antibodies in early pregnancy and preterm delivery. *Obstet Gynecol*. 2010 Jul;116(1):58–62.
209. Kilic S, Tasdemir N, Yilmaz N, Yuksel B, Gul A, Batioglu S. The effect of anti-thyroid antibodies on endometrial volume, embryo grade and IVF outcome. *Gynecol Endocrinol*. 2008 Nov;24(11):649–55.
210. Poppe K, Velkeniers B, Glinde D. Thyroid disease and female reproduction. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007 Mar;66(3):309–21.
211. Glinde D, Soto MF, Bourdoux P, Lejeune B, Delange F, Lemone M, et al. Pregnancy in patients with mild thyroid abnormalities: maternal and neonatal repercussions. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Aug;73(2):421–7.

212. Lejeune B, Grun JP, de Nayer P, Servais G, Glinoeur D. Antithyroid antibodies underlying thyroid abnormalities and miscarriage or pregnancy induced hypertension. *Br J Obstet Gynaecol*. 1993 Jul;100(7):669–72.
213. Mecacci F, Parretti E, Cioni R, Lucchetti R, Magrini A, La Torre P, et al. Thyroid autoimmunity and its association with non-organ-specific antibodies and subclinical alterations of thyroid function in women with a history of pregnancy loss or preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2000 Feb;46(1):39–50.
214. De Vivo A, Mancuso A, Giacobbe A, Moleti M, Maggio Savasta L, De Dominicis R, et al. Thyroid function in women found to have early pregnancy loss. *Thyroid*. 2010 Jun;20(6):633–7.
215. Muller AF, Verhoeff A, Mantel MJ, Berghout A. Thyroid autoimmunity and abortion: a prospective study in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1999 Jan;71(1):30–4.
216. Velkeniers B, Van Meerhaeghe A, Poppe K, Unuane D, Tournaye H, Haentjens P. Levothyroxine treatment and pregnancy outcome in women with subclinical hypothyroidism undergoing assisted reproduction technologies: systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update*. 2013;19(3):251–8.
217. Weghofer A, Himaya E, Kushnir VA, Barad DH, Gleicher N. The impact of thyroid function and thyroid autoimmunity on embryo quality in women with low functional ovarian reserve: a case-control study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015 May;13:43.
218. Toulis KA, Goulis DG, Venetis CA, Kolibianakis EM, Tarlatzis BC, Papadimas I. Thyroid autoimmunity and miscarriages: the corpus luteum hypothesis. *Med Hypotheses*. 2009 Dec;73(6):1060–2.
219. Cramer DW, Sluss PM, Powers RD, McShane P, Ginsburgs ES, Hornstein MD, et al. Serum prolactin and TSH in an in vitro fertilization population: is there a link between fertilization and thyroid function? *J Assist Reprod Genet*. 2003 Jun;20(6):210–5.
220. Matalon ST, Blank M, Levy Y, Carp HJA, Arad A, Burek L, et al. The pathogenic role of anti-thyroglobulin antibody on pregnancy: evidence from an active immunization model in mice. *Hum Reprod*. 2003 May;18(5):1094–9.

## **Biografija autora**

Sanja Medenica je rođena 04.10.1984. godine u Baru, Crna Gora. Upisala je Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu 2003.godine. Diplomirala je 15. jula 2009. godine sa prosečnom ocenom 9.63. U periodu od marta 2010. do septembra 2011. godine volonterski je radila na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Specijalističke akademske studije iz oblasti Endokrinologije na Medicinskom fakultetu u Beogradu je upisala 2009.godine. Završni specijalistički akademski rad pod nazivom „Značaj punkcije tankom iglom u dijagnostici tiroidne nodozne bolesti” odbranila je 22. juna 2011.godine. Doktorske studije iz oblasti Endokrinologije upisala je 2011.godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Miloša Žarkovića. Bila je angažovana kao saradnik u nastavi na predmetu Histologija sa embriologijom na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici. Od 11.januara 2012.godine je zaposlena na Odeljenju endokrinologije, Interne klinike Kliničkog centra Crne Gore u Podgorici. Specijalističke studije iz oblasti Interne medicine je upisala 29.decembra 2014.godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Bila je učesnik brojnih seminara i kongresa iz oblasti endokrinologije i autor je naučnih i stručnih radova iz oblasti endokrinologije i drugih oblasti interne medicine.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Sanja Medenica

broj upisa EN-01/11

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

“UTICAJ PRISUSTVA TIROID-PEROKSIDAZNIH ANTITELA NA ISHOD VANTELESNE OPLODNJE”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 26.11.2018.

Sanja Medenica



Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Sanja Medenica

Broj upisa EN-01/11

Studijski program Endokrinologija

Naslov rada "UTICAJ PRISUSTVA TIROID-PEROKSIDAZNIH ANTITELA NA ISHOD  
VANTELESNE OPLODNJE"

Mentor Prof.dr Miloš Žarković

Potpisani Sanja Medenica

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 26. 11. 2018.

Sanja Medenica

**Prilog 3.**

**Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

“UTICAJ PRISUSTVA TIROID-PEROKSIDAZNIH ANTITELA NA ISHOD VANTELESNE OPLODNJE”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na polednjoj listi).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 26.11.2018.

Sanja Medenica