

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Tina Sušanj Šepić

AUTOIMUNI TIREOIDITIS I GENETIČKI ČIMBENICI KAO UZROK
DISFUNKCIJE JAJNIKA U ŽENA LIJEČENIH POSTUPCIMA
MEDICINSKI POMOGNUTE OPLODNJE

Doktorski rad

Rijeka 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Tina Sušanj Šepić

AUTOIMUNI TIREOIDITIS I GENETIČKI ČIMBENICI KAO UZROK
DISFUNKCIJE JAJNIKA U ŽENA LIJEČENIH POSTUPCIMA
MEDICINSKI POMOGNUTE OPLODNJE

Doktorski rad

Mentor: prof.dr.sc. Neda Smiljan Severinski, dr.med

Komentor: izv.prof.dr.sc. Sanja Dević Pavlić, dipl. sanit. ing

Rijeka 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Tina Sušanj Šepić

AUTOIMMUNE THYROIDITIS AND GENETIC FACTORS AS A
CAUSE OF OVARIAN DYSFUNCTION IN WOMEN TREATED WITH
ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY

Doctoral thesis

Mentor: Prof. Neda Smiljan Severinski, MD, PhD

Co-mentor: Assoc. Prof. Sanja Dević Pavlić, PhD

Rijeka 2025.

Mentor: prof.dr.sc. Neda Smiljan Severinski, dr.med

Komentor: izv.prof.dr.sc. Sanja Dević Pavlić, dipl. sanit. ing

Doktorski rad obranjen je dana _____ 2026. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u

Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Rad ima ____ listova

UDK: _____

Predgovor

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za humanu reprodukciju Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra u Rijeci i Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci pod mentorstvom prof.dr.sc. Nede Smiljan Severinski i komentorstvom izv.prof.dr.sc. Sanje Dević Pavlić, u sklopu doktorskog studija Biomedicina. Istraživanje je provedeno uz potporu projekta prof.dr.sc. Anđelke Radojčić Badovinac „Ekstracelularne vezikule humane folikularne tekućine: sadržaj i uloga u sazrijevanju oocite i kvaliteti embrija”.

Zahvale

Sažetak

Uvod: Autoimuni tireoiditis (AIT) povezan je sa smanjenom plodnošću, no negativni utjecaj na ishode medicinski pomognute oplodnje (MPO) ostaje kontroverzan. Jedan od dodatnih čimbenika koji može negativno utjecati na reproduktivnu funkciju je varijabilnost gena za metilentetrahidrofolat reduktazu (*MTHFR*), koji sudjeluje u metabolizmu folata i metilaciji deoksiribonukleinske kiseline (DNK).

Ciljevi: Procijeniti utječe li AIT na ishode kontrolirane ovarijske hiperstimulacije (KOH) ovisno o ovarijskoj rezervi (OR) ili je AIT neovisan negativan čimbenik koji utječe na ishode KOH te utvrditi postoji li povezanost između prisutnosti AIT i *MTHFR* polimorfizama te rizika za slabiji odgovor jajnika tijekom KOH-a.

Ispitanice i metode: U istraživanje su uključene 341 eutiroidne neplodne ispitanice mlađe od 38 godina koje su se liječile postupcima MPO. Odgovor jajnika na hormonsku stimulaciju uspoređeni su između sudionica istraživanja s AIT (N=191) i AIT negativnih kontrolnih žena iste dobi s normalnom OR (N=150). Skupina ispitanica s AIT je podijeljena u dvije podskupine na osnovi procijenjene OR: AIT-1 podskupinu s očuvanom OR (N=120) i AIT-2 podskupinu sa smanjenom OR (N=71). Ispitanicama s AIT (N=143) su prikupljeni i uzorci periferne krvi za genotipizaciju *MTHFR* polimorfizama.

Rezultati: Prosječna vrijednost aspiriranih oocita i udio MII oocita bila je značajno manja u podskupinama AIT-1 i u AIT-2 u usporedbi s kontrolnom skupinom (AIT-0). Uočili smo značajno manji udio oplođenih oocita, a time i udio zametaka u razvoju 3. i 5. dana u AIT-1 podskupini u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nije bilo značajne razlike u srednjem postotku MII oocita, udjelu oplodnje i udjelu zametaka u razvoju između AIT-1 i AIT-2 skupina. Dokazana je značajna razlika u distribuciji genotipova C677T polimorfizma *MTHFR* gena pri čemu su T alel i TT genotip značajno češći u podskupini AIT-2 u odnosu na podskupinu AIT-1. U podskupini AIT-1 zabilježen je blagi negativan trend u udjelu MII oocita ali veći udio zametaka trećeg preimplantacijskog dana kod nositeljica CT i TT genotipova C677T polimorfizma u odnosu na CC genotip.

Zaključci: Autoimuni tireoiditis je višestruki negativni prediktor ishoda MPO s utjecajem na sazrijevanje i oplodnju oocita, i posljedično razvoj zametaka bez obzira na OR. Genetička analiza ukazuje na moguću ulogu polimorfizama C677T i A1298C u genu *MTHFR* kao dodatnih modulatora ovarijske funkcije u žena s AIT. Integracija genetskih i imunoloških parametara mogla bi predstavljati ključni korak prema personaliziranoj medicini u MPO postupcima.

ključne riječi: Autoimuni tireoiditis; Medicinski pomognuta oplodnja; Metilentetrahidrofolat reduktaza; Neplodnost; Polimorfizam jednog nukleotida.

Summary

Introduction: Autoimmune thyroiditis (AIT) is associated with reduced fertility; however, its negative impact on assisted reproductive technology (ART) outcomes remains controversial. One additional factor that may adversely affect reproductive function is variability in the gene for methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) which participates in folate metabolism and deoxyribonucleic acid methylation.

Objectives: To evaluate whether AIT affects the outcomes of controlled ovarian hyperstimulation (COH) depending on ovarian reserve (OR), or whether AIT is an independent negative factor influencing COH outcomes, and to determine whether there is an association between the presence of AIT and *MTHFR* polymorphisms and the risk of a poor ovarian response during COH.

Subjects and Methods: The study included 341 euthyroid infertile women under the age of 38 who underwent ART procedures. Ovarian response to hormonal stimulation was compared between participants with AIT (N=191) and AIT-negative control women of the same age with normal OR (N=150). The AIT group was divided into two subgroups based on assessed OR: AIT-1 subgroup with preserved OR (N=120) and AIT-2 subgroup with reduced OR (N=71). Blood samples were collected from AIT patients (N=143) for genotyping of *MTHFR* polymorphisms.

Results: The average number of aspirated oocytes and the proportion of MII oocytes were significantly lower in both the AIT-1 and AIT-2 subgroups compared to the control group (AIT-0). A significantly lower proportion of fertilized oocytes, and consequently, a lower proportion of cleavage stage embryos and blastocysts, was observed in the AIT-1 subgroup compared to the control group. There was no significant difference in the mean percentage of MII oocytes, fertilization rate, or embryo development rate between the AIT-1 and AIT-2 groups. A significant difference was found in the distribution of C677T *MTHFR* gene polymorphism genotypes, with the T allele and TT genotype being significantly more frequent in the AIT-2 subgroup compared to the AIT-1 subgroup. In the AIT-1 subgroup, a slight negative trend in the proportion of MII oocytes was observed, but a higher proportion of day 3 preimplantation embryos was noted among carriers of the CT and TT genotypes of the C677T polymorphism compared to those with the CC genotype.

Conclusions: Autoimmune thyroiditis is a multifactorial negative predictor of ART outcomes, affecting oocyte maturation and fertilization, and consequently embryo development, regardless of the OR. Genetic analysis suggests a potential role of the C677T and A1298C polymorphisms in the *MTHFR* gene as additional modulators of ovarian function in women with AIT. The integration of genetic and immunological parameters could represent a key step toward personalized medicine in ART procedures.

keywords: Assisted reproductive technology; Autoimmune thyroiditis; Infertility; Methylenetetrahydrofolate reductase; Single nucleotide polymorphism.

SADRŽAJ

1.	UVOD I PREGLED ISTRAŽIVANJA	1
1.1.	Autoimuno oboljenje štitnjače i neplodnost.....	1
1.2.	Autoimuno oboljenje štitnjače i medicinski pomognuta oplodnja.....	4
1.2.1.	Ovarijska rezerva u žena s autoimunošću štitnjače.....	4
1.2.2.	Autoimunost štitnjače i ishodi medicinski pomognute oplodnje.....	6
1.2.3.	Patofiziologija autoimunog tireoiditisa, neplodnosti i reproduksijskih neuspjeha.....	8
1.3.	Metilentetrahidrofolat reduktaza i autoimuno oboljenje štitnjače.....	10
1.4.	Metilentetrahidrofolat reduktaza u reproduksijskim zbivanjima.....	13
1.4.1.	Metilentetrahidrofolat reduktaza i medicinski pomognuta oplodnja.....	14
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	17
3.	ISPITANICE I METODE.....	18
3.1.	Plan istraživanja.....	18
3.2.	Ispitanice.....	18
3.3.	Metode.....	20
3.3.1.	Analiza baze medicinskih podataka.....	20
3.3.2.	Kemiluminiscentne metode.....	21
3.3.3.	Genotipizacija polimorfizama metilentetrahidrofolat reduktaze.....	23
3.4.	Statistička obrada podataka.....	26
4.	REZULTATI	27
4.1.	Rezultati retrospektivnog istraživanja.....	27
4.1.1.	Životna dob ispitanica	27
4.1.2.	Usporedbe vrijednosti tireotropina i spolnih hormona prema podskupinama.....	28
4.1.3.	Rezultati ovarijske stimulacije.....	35
4.1.4.	Kvantitativni i kvalitativni pokazatelji ovarijske stimulacije (oocite i zametci).....	38
4.2.	Genetička analiza čimbenika koagulacije u ispitanica s autoimunim tireoiditisom.....	48

4.2.1. Analiza frekvencije genotipova i alela MTHFR C677T i A1298C u podskupinama ispitanica.....	48
4.2.2. Analiza utjecaja genotipova MTHFR C677T i A1298C na ishode ovarijske stimulacije.....	50
5. DISKUSIJA.....	58
6. ZAKLJUČCI.....	67
7. LITERATURA.....	69
ILUSTRACIJE.....	84
Popis tablica.....	84
Popis slika.....	85
POPIS POKRATA.....	86
ŽIVOTOPIS.....	88

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Autoimuno oboljenje štitnjače i neplodnost

Neplodnost se definira kao nemogućnost ostvarivanja kliničke trudnoće nakon 12 ili više mjeseci redovitih nezaštićenih spolnih odnosa [1]. Ženski čimbenici, poput poremećaja ovulacije, endometrioze i bolesti jajovoda, odgovorni su za oko 35 % slučajeva, dok muški čimbenici čine približno 30 %. Kombinirani uzroci sudjeluju u 20 % slučajeva, a u preostalih 15 % uzrok ostaje nepoznat, odnosno riječ je o idiopatskoj neplodnosti. Među brojnim čimbenicima koji mogu pridonijeti neplodnosti kod žena, osobitu pažnju zahtijevaju disfunkcija štitnjače i/ili autoimuna bolest štitnjače [1,2]. Disfunkcija štitnjače najčešći je endokrinološki poremećaj u žena reproduktivnoj dobi, a često je povezana s nepravilnostima menstrualnog ciklusa, anovulacijom te posljedičnom smanjenom plodnošću [2–5]. Poremećaji funkcije štitnjače odražavaju se i na rad drugih endokrinih žlijezdi, uključujući spolne žlijezde, čime dodatno utječu na reproduktivnu funkciju. Autoimuni tireoiditis (AIT) karakteriziran je prisutnošću cirkulirajućih antitijela usmjerenih na tireoidnu peroksidazu (Anti-TPO) i antitijela na tireoglobulin (Anti-Tg). Autoimuni tireoiditis predstavlja vodeći uzrok disfunkcije štitnjače te obuhvaća klinički spektar koji se kreće od eutireoidnog tireoiditisa, preko subkliničke i manifestne hipotireoze, do rjeđe prisutne prolazne tireotoksikoze [2,6]. Vrijednosti mikrosomskih protutijela u serumu neplodnih žena značajno su veće u usporedbi s plodnim ženama slične dobi [7]. Ova povezanost ukazuje na mogući utjecaj autoimune aktivnosti štitnjače na plodnost, neovisno o prisutnosti ili izraženosti kliničke disfunkcije štitnjače. Prethodna istraživanja pokazala su da i kod neplodnih žena s očuvanom funkcijom štitnjače, povišene koncentracije antitireoidnih antitijela (ATA) u serumu upućuju na prisutnost autoimune bolesti štitnjače. Takva autoimuna aktivnost povezana je s nepovoljnim ishodima trudnoće, uključujući povećan rizik spontanih pobačaja, manju vjerojatnost implantacije i rođenja živog djeteta, kako u spontanim ciklusima, tako i nakon liječenja neplodnosti [2–7]. Poppe i suradnici ukazuju na povećanu prevalenciju AIT među ženama koje se liječe zbog neplodnosti, a koja iznosi približno 18% [3,4]. Prema rezultatima drugih studija, prevalencija AIT-a još je veća u određenim podskupinama neplodnih žena: oko 26% u žena liječenih zbog anovulacije, 18–40% u žena s policističnim ovarijским sindromom (PCOS) te 25–46% u žena s endometrioza koje se liječe zbog neplodnosti [2,6]. Stoga su probir na disfunkciju štitnjače i njeno autoimuno oboljenje obuhvaćeni u preporukama za početnu dijagnostiku uzroka neplodnosti [8]. Hormoni štitnjače imaju važnu regulacijsku ulogu u osovini hipotalamus–hipofiza–jajnici. Njihov utjecaj na reproduktivnu funkciju očituje se kroz regulaciju lučenja luteinizirajućeg hormona (LH), djelovanje na funkciju granuloznih stanica, ekspresiju LH receptora i receptora za humani korionski gonadotropin (hCG) te razvoj folikula [9,10].

Osim toga, hormoni štitnjače igraju ključnu ulogu u procesu implantacije i ranom embrionalnom razvoju, djelujući na endometrij i razvoj posteljice [11]. Prema dosadašnjim istraživanjima tiroidni stimulirajući hormon-tireotropin (TSH) se smatra najosjetljivijim pokazateljem poremećaja funkcije štitnjače te se koristi u dijagnostici neplodnosti [3–5]. Međutim, kada se analiziraju studije koje istražuju utjecaj disfunkcije štitnjače povezane s AIT na reproduksijske ishode, rezultati su često proturječni i bez jedinstvenog zaključka [2–7,9,10,12]. Granična vrijednost TSH u serumu koja se koristi za definiranje eutireoidnog statusa u trudnoći mijenjala se tijekom vremena i još uvijek je predmet stručnih rasprava [2]. Prema smjernicama Američkog udruženja za štitnjaču (engl. American Thyroid Association - ATA) iz 2011. godine, gornja granica referentnog raspona koncentracije TSH u prvom tromjesečju trudnoće bila je postavljena na 2,5 mIU/L [13]. Međutim, u revidiranim smjernicama iz 2017. godine ta je vrijednost povećana na 4,0 mIU/L, uz preporuku da se koristi laboratorijski specifičan referentni raspon kada je dostupan [14]. Europsko udruženje za štitnjaču (engl. European Thyroid Association - ETA) u svojim smjernicama iz 2021. godine posebno se osvrnulo na disfunkciju štitnjače u kontekstu medicinski pomognute oplodnje (MPO), naglašavajući potrebu za pažljivim praćenjem i individualiziranim pristupom bolesnicama s AIT koje se liječe zbog neplodnosti [8]. Prema nekim autorima, u kontekstu MPO, koncentracija TSH od 4,0 mIU/L predstavlja graničnu vrijednost za uvođenje nadomjesne terapije levotiroksinom (LT4). Čini se da primjena LT4 može povećati postotak živorođene djece samo kada je koncentracija TSH veća od 4,0 mIU/L, dok se u nižim vrijednostima ne bilježi jasni terapijski učinak [15]. Rezultati TABLET studije ("Levothyroxine in Women with Thyroid Peroxidase Antibodies before Conception") dodatno podupiru oprez u propisivanju LT4. Ova prospektivna, randomizirana studija nije dokazala značajni utjecaj terapije LT4 na pozitivne ishode trudnoća u eutireoidnih žena pozitivnih na Anti-TPO koje su liječene *in vitro* oplodnjom (IVF). Rezultati spomenute studije otvaraju važna pitanja o ulozi autoimunosti u etiologiji spontanih pobačaja. Naime, nedostatak učinka LT4 terapije podupire teoriju da su uzrok spontanih pobačaja u ovih bolesnica prije svega imunološki poremećaji, a ne relativna insuficijencija hormona štitnjače [15]. Posebnu dilemu predstavlja liječenje eutireoidnih žena s AIT-om. Dok pojedine studije ukazuju na pozitivan učinak nadomjesne terapije LT4 u smanjenju rizika nepovoljnog ishoda trudnoće, druge studije nisu pokazale terapijski benefit [8,15]. Ova nesuglasja dodatno naglašavaju potrebu za novim istraživanjima s ciljem definiranja klinički korisnih biomarkera i terapijskih smjernica. U nastojanju da se razjasne patofiziološki mehanizmi i uloga AIT u reproduksijskom neuspjehu neovisno o funkciji štitnjače, nekoliko je studija bilo usmjereno na potencijalne imunološki posredovane učinke AIT-a na jajnik, endometrij te na feto-maternalnu jedinicu. Međutim, dostupni podaci su često kontradiktorni, temeljeni na malim uzorcima ispitanica

i spekulativnim zaključcima, pa zahtijevaju dodatne potvrde kroz robustnije istraživačke modele [2–10].

Meta-analiza koju su proveli Romitti i suradnici 2018. godine pokazala je značajnu povezanost PCOS-a i AIT-a [16]. Na temelju tih rezultata, autori preporučuju uvođenje probira funkcije štitnjače i određivanje ATAt u žena s dijagnozom PCOS-a. Povišeni autoimuni serološki markeri identificirani u podskupini žena s PCOS-om upućuju na moguću patofiziološku povezanost autoimunosti i ovog sindroma [17,18]. Slično tome, nekoliko je studija istaknulo moguću povezanost između disfunkcije štitnjače i endometrioze, sugerirajući da bi zajednički imunološki ili endokrinološki mehanizmi mogli sudjelovati u patogenezi obje bolesti [19–21]. Ipak, točna uloga disfunkcije štitnjače u razvoju endometrioze još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Nažalost, patofiziološki putevi kojima AIT može negativno utjecati na reproduksijske funkcije ostaju nedovoljno poznati. Zbog toga su terapijske mogućnosti u bolesnica s AIT-om, osobito onih koje imaju očuvanu funkciju štitnjače, i dalje ograničene, a temelje se na parcijalnim i često kontradiktornim dokazima.

Jedan od potencijalnih mehanizama kojim AIT može pridonijeti neplodnosti jest unakrsna reaktivnost Anti-TPO s receptorima za hCG u zoni pellucidi oocite [22]. Takva imunološka interferencija može ometati proces oplodnje i implantacije. Dodatno, enzimi uključeni u sintezu hormona štitnjače, poput dejodinaza i tiroidna peroksidaza (TPO), identificirani su u granulosa stanicama jajnika, endometriju, sinciciotrofoblastu i invazivnom trofoblastu [23–26]. Ovi nalazi podupiru hipotezu o mogućoj lokalnoj sintezi hormona štitnjače u reproduksijskim tkivima, koja bi mogla igrati važnu ulogu u folikulogenezi, pripremi endometrija za implantaciju te ranom razvoju posteljice. U tim okolnostima, autoimuna aktivnost usmjerena protiv štitnjače može uzrokovati lokalni manjak hormona, nevidljiv na razini seruma, ali dovoljan da naruši implantaciju i placenciju. Takav mehanizam mogao bi objasniti reproduksijske neuspjehe i opstetričke komplikacije kod eutireoidnih žena s AIT-om [23,24]. Antitijela usmjerena na tiroidnu peroksidazu prepoznata su kao najosjetljiviji indikator AIT-a i povezana su s povećanim rizikom razvoja hipotireoze [6]. Većina dostupnih publikacija je bila fokusirana na ispitivanje utjecaja Anti-TPO, ili kombinacije Anti-TPO i Anti-Tg. Malo je studija koje istražuju izolirani učinak Anti-Tg, premda izolirana pozitivnost na Anti-Tg može biti jednako česta kao i ona na Anti-TPO – 5% naspram 4% [27]. Izolirana prisutnost Anti-Tg može imati i klinički značajne štetne učinke. Antitireoidna antitijela mogu ometati odgovor štitnjače na stimulaciju hCG-om, a dodatno su povezana s povećanim rizikom prijevremenog poroda i niže porođajne težine novorođenčadi [28,29]. Smjernice ATA iz 2017. godine naglašavaju potrebu za daljnjim istraživanjem kliničkog značaja izolirane Anti-Tg pozitivnosti [14]. Brojna pitanja o stvarnom utjecaju AIT-a, neovisno o vrijednostima hormona štitnjače, na reproduksijski ishod ostaju bez jas-

nog odgovora. Dublje razumijevanje patofiziološke povezanosti između AIT-a i neplodnosti moglo bi unaprijediti dijagnostički pristup i terapijske strategije u liječenju neplodnih žena s potvrđenim AIT.

1.2. Autoimuno oboljenje štitnjače i medicinski pomognuta oplodnja

1.2.1. Ovarijska rezerva u žena s autoimunošću štitnjače

Ovarijska rezerva (OR) koja uključuje ukupnu količinu, primordijalnih i primarnih folikula, a osobito funkcionalna OR (broj rastućih folikula nakon regrutacije) predstavlja važan pokazatelj reproduktivnog potencijala žene [6]. U više istraživanja promatran je utjecaj AIT na OR, pri čemu su korišteni prediktivni markeri kao što su koncentracija Anti-Müllerovog hormona (AMH), broj antralnih folikula (AFC) te vrijednosti bazalnog folikulostimulirajućeg hormona (FSH) [30–35]. Neka od tih istraživanja ukazala su na moguću povezanost između AIT i smanjene OR, pa čak i s pojavom preuranjenog zatajenja jajnika [34–38]. Prijevremena insuficijencija jajnika (POI) klinički je sindrom koji se definira kao gubitak funkcije jajnika prije navršene 40. godine života. Autoimuni uzrok prisutan je u otprilike 4% do 30% slučajeva POI, pri čemu su najčešći udruženi poremećaji upravo bolesti štitnjače i nadbubrežne žlijezde [39,40]. U većini slučajeva etiologija disfunkcije jajnika ostaje nepoznata [40]. U nedavnoj meta-analizi potvrđena je veća učestalost pozitivnih Anti-TPO u žena s POI, dok ista povezanost nije potvrđena za Anti-Tg [38]. Nije u potpunosti razjašnjeno utječe li poremećaj funkcije štitnjače ili njena autoimunost na funkcionalnu OR [41]. Iako je autoimuno oštećenje jedne endokrine žlijezde češće povezano s oštećenjem drugih endokrinoloških žlijezda zbog dijeljenja zajedničkih proteina, neki istraživači smatraju da oštećenje jajnika uzrokovano pozitivnim ATAt nije čest uzrok smanjenja funkcije jajnika [42–44].

U meta-analizi Lia i suradnika [38], koja je obuhvatila 30 studija objavljenih između 1997. i 2021. godine, zaključeno je da žene reproduktivske dobi s AIT imaju niže koncentracije AMH i manji AFC, što upućuje na povezanost AIT-a sa smanjenom OR. U nedavnoj publikaciji istog autora [35], retrospektivna analiza 4302 eutireoidnih žena pokazala je da je AIT bio značajno povezan s pojavom POI-a samo u podskupini žena s vrijednostima TSH $> 2,5$ μ IU/ml. Ta povezanost nije bila prisutna u žena s vrijednostima TSH $\leq 2,5$ μ IU/ml, što upućuje na zaključak da relativna insuficijencija hormona štitnjače, udružena s autoimunim procesom, može imati ulogu u oštećenju funkcije jajnika. U skladu s tim rezultatima ETA u svojim smjernicama predlaže testiranje na Anti-TPO kod

žena s POI [8]. Utjecaj AIT-a na rezervu jajnika i dalje je predmet istraživanja te su studije i dalje široko kontradiktorne [30-44].

U studiji Korevaar i suradnika, koja je obuhvatila 436 žena liječenih zbog neplodnosti, funkcija štitnjače ili pozitivnost na Anti-TPO nisu bili povezani s manjim AFC-om. Međutim, pozitivnost na Anti-Tg bila je povezana s većim AFC-om. Suprotno, među ženama sa smanjenom OR ili neobjašnjenom neplodnošću, pozitivnost na Anti-TPO (ali ne i Anti-Tg), zajedno s nižim vrijednostima slobodnog trijodtironina (FT3), bila je povezana s manjim AFC-om [34]. U studiji Chena i suradnika, koja je obuhvatila 1044 neplodne žene s AIT liječene postupcima MPO, vrijednosti TSH, bile su usporedive među ženama s varijabilnom OR procijenjenom na osnovi vrijednosti AMH. Nakon što su žene s poznatim genetskim uzrocima smanjene OR isključene iz istraživanja, pozitivnost na Anti-TPO je bila češća u ispitanicama s niskom OR. To sugerira povezanost Anti-TPO s idiopatski smanjenom OR u slučajevima idiopatske neplodnosti [36]. Suprotno tome, u velikoj studiji Polyzoza i suradnika, koja je obuhvatila 5000 žena, nisu pronađene razlike u prevalenciji AIT niti u prevalenciji očite ili subkliničke hipotireoze među ženama s niskom, normalnom ili visokom OR, procijenjenoj na osnovi dobno specifičnih vrijednosti AMH [43]. U studiji Bahria i suradnika, koja je obuhvatila 775 žena reproduktivske dobi bez disfunkcije štitnjače ili jajnika, žene s vrijednostima AMH u donjem kvartilu za dob imale su veću koncentraciju Anti-TPO na početku studije. Također, tijekom vremena dokazana je veća učestalost pozitivnosti na Anti-TPO [45]. U studiji Pirgona i suradnika, 30 adolescentica s novootkrivenim AIT su imale normalnu OR, prema procjeni na osnovi AMH, inhibina B, FSH, omjera LH/FSH, estradiola (E2) i AFC [33]. U studiji Ozturk i suradnika, koja je obuhvatila 108 ispitanica s eutireoidnim AIT, redovitim menstrualnim ciklusima i liječenih ili ne supstitucijskom terapijom LT4, utvrđene su niže vrijednosti AMH usporedbi sa zdravim ženama iste dobi [31]. U studiji Weghofer i suradnika, koja je uključivala 225 neplodnih žena, TSH < 3,0 mIU/L bio je povezan s značajno većim vrijednostima AMH u usporedbi s onima s TSH ≥ 3,0 mIU/L, a nakon usklađivanja rezultata za autoimunost štitnjače i dobi. Ovi rezultati sugeriraju da funkcija štitnjače, čak i unutar eutireoidnog raspona vrijednosti hormona, ima značajniji utjecaj na OR od samog AIT-a [41]. Osuka i suradnici nisu pronašli značajnu razliku u serumskoj razini AMH vrijednosti u žena s AIT, no ističu da funkcija štitnjače može dodatno smanjiti već smanjenu OR [44].

1.2.2. Autoimunost štitnjače i ishodi medicinski pomognute oplodnje

Značenje ATAt u postupcima MPO predmetom je rasprava gotovo tri desetljeća, a studije na tu temu i dalje ostaju široko kontroverzne. Višestruke kliničke studije, sustavni pregledi i metaanalize procijenili su učinak AIT-a na ishode MPO postupaka s proturječnim zaključcima. Razlike među studijama postoje u veličini uzorka, dizajnu, uzrocima neplodnosti, vrsti MPO-a, graničnoj razini TSH koja se koristi za definiranje eutireoze, kao i u krajnjim ciljnim točkama [46-56].

Postoje brojni dokazi da AIT ima negativan učinak na reproduksijske ishode, čak i kod eutireoidnih žena [49-61]. Studije o liječenju LT4 prije začeća također su nedosljedne i kontroverzne [8,15,41,53,54,61]. Prethodne studije izvještavaju o lošijoj kvaliteti zametaka [51,52], manjem postotku kliničkih trudnoća, većem riziku spontanog pobačaja i manjem udjelu živorođene djece u žena s AIT koje su liječene postupcima MPO. [50,61]. Rezultati nekoliko nedavnih studija [62-64], sveobuhvatnih pregleda [59,64] i meta-analiza [54,65], daju proturiječne zaključke te nije dokazan nikakav štetni učinak AIT-a na ishode MPO-a. Jedno od mogućih objašnjenja za ovu nekonzistentnost različitih istraživanja mogla bi biti sve češća primjena intracitoplazmatske injekcije spermija (ICSI) kao metode oplodnje oocita. Iako se ICSI najčešće koristi u slučajevima muške neplodnosti, ETA predlaže primjenu ICSI oplodnje i u slučaju neplodnih žena s AIT [8].

Rezerva jajnika ključni je čimbenik u predviđanju tijeka i ishoda postupaka MPO, jer utječe na odgovor jajnika tijekom KOH [6]. Magri i suradnici su utvrdili da žene s AIT imaju niži AMH i veću vrijednost FSH u usporedbi s AIT-negativnim ženama [48]. Lošiji ishod KOH-a također je primijećen kod žena s AIT i većim vrijednostima AMH. Iako smanjena OR pogoršava ishod KOH neovisno o AIT-u, AIT ima dodatni negativni utjecaj na odgovor jajnika i kod žena s očuvanom OR [48]. Prethodna istraživanja Magri i suradnika pokazala su učinak funkcije štitnjače na KOH. Naime, u skupini od 262 žena koje su liječene postupkom IVF-a, žene s AIT i koncentracijom TSH nižom od 2,5 mIU/L imale su bolji odgovor jajnika na hormonsku stimulaciju, što je bilo povezano s većim vrijednostima E2 u serumu, većim omjerom E2/rFSH i većim brojem MII oocita u usporedbi s bolesnicama čija je koncentracija TSH bila iznad 2,5 mIU/L [49].

Zhong i suradnici su primijetili da bolesnice s pozitivnim ATAt imaju značajno manji postotak oplodnje oocita, implantacije i začetih trudnoća, te veći rizik spontanog pobačaja nakon postupka IVF u usporedbi s onima koje nisu imale dokazana ATAt. Stoga se može zaključiti da prisutnost ATAt predstavlja rizik za ishod trudnoće, čak i nakon postupka MPO [47]. Weghofer i suradnici su procjenjivali kvalitetu embrija eutireoidnih žena s niskom OR koje su liječene IVF-om. Slična

kvaliteta embrija primijećena je kod žena s niskim ili visokim normalnim koncentracijama TSH (cut-off vrijednost 2,5 mIU/L), dok je oslabljena kvaliteta embrija zabilježena kod žena s pozitivnim Anti-TPO i koncentracijom TSH $\leq 2,5$ mIU/L. Povećanje koncentracije TSH bilo je povezano s lošijom kvalitetom embrija, a trend prema sličnom učinku primijećen je i kod žena s pozitivnim Anti-TPO [51]. U retrospektivnoj kohortnoj studiji Andrisani i suradnika, prikazani su rezultati liječenja MPO i razvoja zametaka u 123 eutireoidne žene s ili bez AIT. Kvaliteta embrija bila je značajno narušena u žena s barem jednim pozitivnim ATAt.

Međutim, nisu uočene razlike u serumskim vrijednostima AMH, FSH, broju aspiriranih i oplođenih oocita, kao ni u postotku implantacije i rane trudnoće [52]. Meta-analiza Venables i suradnika, koja uključuje 14 studija provedenih u skupini žena s eutireoidnim AIT, nije utvrdila razlike u ishodima postupaka MPO (broj aspiriranih oocita, broj prenesenih embrija, udio kliničkih trudnoća, učestalost spontanog pobačaja) u usporedbi sa ženama koje nemaju AIT [65]. Meta-analiza prospektivnih studija koja je obuhvatila 1098 neplodnih žena liječenih MPO je pokazala visok rizik spontanog pobačaja u žena s eutireoidnim AIT, ali nije dokazala značajnu razliku u udjelu oplođenih oocita i udjelu kliničkih trudnoća [66]. Više prospektivnih kohortnih studija ukazuje na niži postotak živorođene djece i povećanu učestalost spontanog pobačaja u eutireoidnih žena s AIT koje su bile u postupku MPO [47,53,54,61]. Poppe i suradnici nisu dokazali razlike u stopi začetih trudnoća u 234 eutireoidne žene nakon prvog ciklusa MPO, ali su žene s AIT imale trostruko veći rizik spontanog pobačaja [58]. Slično, Negro i suradnici nisu utvrdili razlike u postotku začetih trudnoća između 412 AIT negativnih i 72 AIT pozitivne žene kojima je u terapiju nasumično uveden LT4 ili placebo. Dvostruko veći rizik spontanog pobačaja ipak nije smanjen usprkos liječenju LT4 u Anti-TPO pozitivnih žena. Ove činjenice povezuju pobačaj s abnormalnim imunološkim odgovorom, a ne s naknadnim blagim zatajenjem funkcije štitnjače [53]. Također, u prospektivnoj studiji Inagaki i suradnika koja je uključivala 590 neplodnih žena s hipotireozom liječenih LT4, uz održavanje serumske koncentracije TSH manje od 2,5 μ IU/mL, veći titar Anti-TPO bio je jedan od čimbenika rizika za nastanak pobačaja nakon IVF-a unatoč nadomjesnom liječenju hormonima štitnjače [54]. Objašnjenje za heterogenost ovih rezultata može se pronaći u dizajnu studija, u pragu vrijednosti TSH kojima se definira eutireoza, kao i u vrsti MPO liječenja. I dalje ostaje važno pitanje: "Koja je optimalna vrijednost koncentracije TSH prije začeća koja određuje uspješne ishode MPO-a u žena s AIT?"

Unuane i suradnici nisu uočili značajne razlike u kumulativnim udjelima porođaja nakon IVF/ICSI između AIT pozitivnih i AIT negativnih žena kad god je primjenjena „cut-off“, koncentracija TSH od 2,5 ili 5,0 mIU/L [63]. Slično, Chai i suradnici [67] nisu pronašli razliku u ishodima IVF-a između žena s koncentracijom TSH manjom ili većom od 4,5 mIU/L. U meta-analizi Zhao i

suradnika koja uključuje 18 publikacija i 14 846 sudionika, nije uočena razlika u ishodima MPO kada je definirana granična koncentracija TSH od 2,5 mIU/L [68]. Međutim, u slučajevima šire granične koncentracije TSH od 3,5-5 mIU/L, uočena je veća učestalost pobačaja.

1.2.3. Patofiziologija autoimunog tireoiditisa, neplodnosti i reproduktivskih neuspjeha

Jasna patofiziološka veza koja povezuje AIT s neplodnošću i nepovoljnim reproduktivskim ishodima nakon spontanog začeća ili MPO-a nije identificirana. Iako postoji nekoliko hipoteza i potencijalnih patofizioloških mehanizama, nijedna od njih nije potpuno potvrđena. Istraživači pretpostavljaju da bi izravna infiltracija reproduktivskih organa antitijelima štitnjače mogao biti jedan od mehanizama, kao i koegzistencija AIT-a s drugim autoimunim bolestima (bilo organski specifičnim ili sistemskim) [2,6]. Drugi mogući mehanizam uključuje imunološku disfunkciju koja vodi do inhibicije imunološke tolerancije, što može negativno utjecati na reproduktivske procese. Također, relativni nedostatak hormona štitnjače može imati direktne učinke na plodnost i ishod trudnoće. Autoimuni tireoiditis bi mogao predstavljati periferni marker opće imunološke neravnoteže koja utječe na oplodnju, implantaciju i održavanje trudnoće [2,6,69,70]. Imunocitokemijom je dokazana TPO u stanicama granulose kumulusa ljudskog folikula jajnika, čime se podupire hipoteza da bi Anti-TPO mogla ciljati antigen izravno na razini jajnika [23]. Može se nagađati da bi zona pellucida, koja ima važnu funkcionalnu ulogu u interakciji između oocite i spermija, mogla biti meta ATAt [2,23].

Jedan od mehanizama koji nije ovisan o hormonima štitnjače uključuje ulogu nepovoljnog i neprijateljskog imunološkog okruženja na razini folikula jajnika, s TPO kao izravnim antigenom barem u ranoj fazi autoimunog procesa u neplodnosti [6,70]. Antitiroidna antitijela mogu generirati upalni odgovor koji mijenja okruženje sazrijevajuće oocite, i moguće utječe na OR i kvalitetu embrija. Dokazano je da Anti-TPO uzrokuju smrt tireocita putem stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelima (engl. Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity - ADCC) i citotoksičnosti posredovane komplementom C3, a pretpostavlja se da i Anti-Tg djeluje preko ADCC [71], što može oštetiti reproduktivske organe koji izražavaju TPO i tireoglobulin (Tg). Dodatno, unakrsna reaktivnost Anti-TPO s hCG receptorima u zoni pellucidi predložena je kao još jedan potencijalni mehanizam neplodnosti [6,24]. Druga patogenetska hipoteza smatra da bi AIT mogao biti marker generalizirane humoralne i stanične imunološke disfunkcije, što može dodatno pogoršati sposobnost reproduktivskih organa da funkcionalno odgovore na fiziološke i hormonske promjene potrebne za oplodnju i implantaciju. U AIT često dolazi do aktivacije poliklonalnih limfocita B, što je povezano

s povećanim vrijednostima organski nespecifičnih antitijela, poput antifosfolipidnih antitijela (aPL) i antinuklearnih antitijela (ANA). Većina tih autoantitijela dokazano je povezana s reprodukcijom neuspjehom, aPL može unakrsno reagirati s tkivom trofoblasta i placente, čime se smanjuje vitalnost trofoblasta, poremeti sincicijalizacija i invazija trofoblasta [71,72]. Povećana učestalost habitualnih pobačaja zabilježena je kod bolesnica s poliautoimunim poremećajima u usporedbi s bolesnicama koje imaju izolirani AIT [73].

Istodobna prisutnost antiovarijskih autoantitijela, koja su obilježje POI-a, može negativno utjecati na imunološku homeostazu jajnih stanica, narušiti OR, smanjiti kvalitetu jajnih stanica, oslabiti odgovor jajnika na KOH, te posljedično smanjiti uspjeh postupaka MPO.

U bolesnica s AIT dokazano je povišena razina pro-upalnih citokina kao što su interleukin 2 (IL-2), interleukin 17 (IL-17) i interferon γ (INF- γ) u serumu i/ili folikularnoj tekućini zajedno s kvantitativnim i kvalitativnim promjenama T-stanica endometrija sa smanjenjem izlučivanja interleukina 4 (IL-4) i interleukina 10 (IL-10) [2,6,24]. Funkcionalna analiza mononuklearnih stanica periferne krvi bolesnica s AIT u usporedbi kontrolnom skupinom pokazala je promjene urođene imunosti usmjerene na pomoćničke T stanice (Th1), povišene omjere prirodno ubilačkih stanica (NK) i prirodno ubilačkih T stanica (NKT) i pojačanu prirodnu citotoksičnost u AIT pozitivnih eutireoidnih žena [74,75]. Broj i aktivnost NK stanica mogu se povećati ne samo pomoću IL-2 i INF- γ , već i endokrinom i parakrinom aktivnošću TSH [74]. Pomoćničke T stanice proizvode IL-2 i INF- γ , a oni su dokazano povezani s neuspjehom implantacije i nastankom spontanih pobačaja a pro-upalni citokin IL-17 je također uključen u patogenezu pobačaja i prijevremenog poroda [2,75]. Disregulacija NK stanica u perifernoj krvi, s prevalencijom citotoksičnih nad imunoregulacijskim, usko je povezana s reprodukcijom neuspjesima, uključujući habitualne pobačaje i neplodnost [75]. Povećanje postotka citotoksičnih NK stanica u žena s AIT bilo je povezano s reprodukcijom neuspjesima [75]. Ovi podaci sugeriraju da disfunkcija stanične imunosti u bolesnica s AIT, s pro-upalnim Th1 imunološkim odgovorom i pretjeranom aktivacijom NK stanica može biti uzrok neplodnosti i nepovoljnog reprodukcijom ishoda [69].

Dokazano je da ATAt mogu proći kroz krvno-folikularnu barijeru tijekom sazrijevanja folikula [76,77]. U studiji Monteleone i suradnika, koja je obuhvatila 31 ženu liječenu IVF oplodnjom, u 14 bolesnica s AIT, Anti-TPO i Anti-Tg su bila mjerljiva u folikularnoj tekućini na dan aspiracije jajnih stanica, a njihove koncentracije su pozitivno korelirale s onima u krvi. Koncentracije ATAt u folikularnoj tekućini AIT pozitivnih ispitanica bile su otprilike upola niže u odnosu na vrijednosti u serumu, što ukazuje na to da ATAt prolaze krvno-folikularnu barijeru i postižu koncentraciju proporcionalnu njihovim vrijednostima u krvi. U navedenoj studiji ishodi liječene neplodnosti

(oplodnja jajnih stanica, kvalitetni embriji i udio začetih trudnoća bili su lošiji u žena s AIT nego u kontrolnoj, AIT-negativnoj skupini, a i udio ranih spontanih pobačaja je bila viša. Prisutnost ATAt može stvoriti citotoksično okruženje koje oštećuje sazrijevajuće jajne stanice, smanjuje njihovu kvalitetu i potencijal oplodnje [76]. Studija Medenice i suradnika potvrdila je povezanost ATAt u folikularnoj tekućini i ishoda MPO-a te sugerirala da je TPO uobičajeni antigen u tkivima štitnjače i jajnika. U 52 žene liječene postupkom IVF utvrđena je statistički značajna korelacija između vrijednosti Anti-TPO i Anti-Tg u serumu i folikularnoj tekućini [77].

1.3. Metilentetrahidrofolat reduktaza i autoimuno oboljenje štitnjače

Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) jedan je od ključnih enzima uključenih u metabolizam folne kiseline i homocisteina, jer katalizira pretvorbu 5,10-metilentetrahidrofolata u 5-metiltetrahidrofolat - spoj neophodan za remetilaciju homocisteina u metionin [78]. Ovaj enzim pripada skupini oksidoreduktaza te ima ulogu u regulaciji koncentracije homocisteina u organizmu [79]. Metionin, kao produkt remetilacije, sudjeluje u sintezi proteina te u procesima metilacije proteina i DNA, odnosno u regulaciji genske ekspresije [78]. Dosad je opisano više od 20 polimorfizama *MTHFR* gena [80]. Dva najčešća jednonukleotidna polimorfizma u *MTHFR* genu su C677T i A1298C (Tablica 1). Radi se o polimorfizmima jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphisms* - SNP), koji su po definiciji prisutni u najmanje 1% populacije te mogu djelovati kao rizični ili protektivni čimbenici za različita stanja i bolesti. Funkcionalni učinci SNP-ova određeni su njihovim položajem u genomu, a mogu se manifestirati kroz promjene u aktivnosti promotora, regulaciji ekspresije gena, učinkovitosti mjesta spajanja i vezanja transkripcijskih faktora, te kroz epigenetičke modifikacije [81].

Najznačajniji polimorfizam *MTHFR* gena s utjecajem na funkciju enzima je C677T (rs180113). Radi se o zamjeni nukleotida citozina timinom na položaju 677 u egzonu 4, što rezultira supstitucijom aminokiseline alanina valinom. Posljedično nastaje termolabilni enzim smanjene aktivnosti [82]. Procjenjuje se da je enzimska aktivnost homozigota TT smanjena na približno 30 %, a heterozigota CT na oko 65 % u odnosu na referentni (CC) genotip (Slika 1) [83]. Posljedično dolazi do hiperhomocisteinemije i smanjenih vrijednosti folata, što može negativno utjecati na metilaciju DNA molekule [84,85].

Polimorfizam A1298C (rs1801131) u *MTHFR* genu podrazumijeva zamjenu adenina citozinom na položaju 1298 u egzonu 7, što rezultira supstitucijom glutaminske kiseline alaninom. Ova promjena dovodi do smanjenja aktivnosti MTHFR enzima u odnosu na referentni (AA) genotip, koja je više

izražena u homozigota, ali za razliku od polimorfne varijante C677T, enzim nije pojačano osjetljiv na temperaturu [86]. Procjenjuje se da heterozigoti AC imaju oko 85 % aktivnosti enzima, dok je kod homozigota CC aktivnost smanjena na približno 70 % u odnosu na divlji tip (Slika 1) [87]. Ovi podaci sugeriraju da A1298C polimorfna varijanta rezultira manjim smanjenjem aktivnosti enzima u usporedbi s C677T polimorfizmom, ali i dalje može imati kliničke implikacije, osobito u kontekstu bolesti štitnjače i reproduktivnog zdravlja.

Za oba polimorfizma *MTHFR* gena, u europskoj populaciji utvrđena je učestalost rijetkih alela – T alela kod polimorfizma C677T te C alela kod polimorfizma A1298C – od približno 30%, dok se homozigotne polimorfne varijante (TT genotip za C677T i CC genotip za A1298C) pojavljuju s učestalošću od oko 10% [88]. Slične vrijednosti zabilježene su i u hrvatskoj populaciji, gdje je učestalost T alela iznosila 32%, a TT genotipa 10% [89].

Tablica 1. Najčešći polimorfizi i genotipovi *MTHFR* gena

Polimorfizam	Promjena nukleotida	Promjena aminokiseline	Mogući genotipovi
C677T (rs1801133)	C → T	Alanin → Valin	CC (divlji tip) CT (heterozigot) TT (homozigot)
A1298C (rs1801131)	A → C	Glutamin → Alanin	AA (divlji tip) AC (heterozigot) CC (homozigot)

GENOTIP		
C677T	A1298	ENZIMSKA AKTIVNOST
CC	AA	100%
CC	AC	85%
CC	CC	70%
CT	AA	65%
CT	AC	48%
TT	AA	30%



Slika 1. MTHFR genotipovi i enzimsko aktivnost [83, 87]

Od njihovog otkrića, polimorfizmi MTHFR opsežno su istraživani među različitim populacijama kako bi se procijenila njihova povezanost s različitim medicinskim stanjima, prvenstveno kardiovaskularnim bolestima, trombozom, komplikacijama u trudnoći, rizikom od zloćudnih bolesti, psihijatrijskim, neurološkim, autoimunim bolestima, bolestima štitnjače itd [79,82,86,90-94]. Metilentetrahidrofolat reduktaza je kritični enzim koji ograničava brzinu u metaboličkom putu pretvorbe homocistein/metionin koji je uključen u patogenezu i progresiju autoimunih bolesti [94]. Budući da polimorfizmi MTHFR mogu uzrokovati hiperhomocisteinemiju i smanjenu dostupnost metilnih skupina zbog poremećenog metabolizma folata, pretpostavlja se da takve promjene mogu utjecati na epigenetičku regulaciju imunoloških gena, pridonoseći razvoju autoimunih bolesti poput AIT-a. U tom kontekstu, disbalans u metilaciji DNK molekule, posredovan MTHFR polimorfizmima, mogao bi predstavljati jedan od mehanizama koji dovodi do gubitka imunološke tolerancije i stvaranja protutijela usmjerenih prema štitnjači [94]. Povezanost MTHFR polimorfizama s autoimunim bolestima, uključujući AIT, postaje sve više predmet interesa različitih istraživača. Nedavne studije pokazale su da dva uobičajena polimorfizma gena *MTHFR* (C677T i A1298C) mogu korelirati s disfunkcijom štitnjače, iako rezultati istraživanja ostaju nedosljedni [90,92,93,95-97]. Štoviše, nekoliko studija je pokazalo da bolesnici s hipotireozom imaju povišene vrijednosti ukupnog homo-

cisteina u serumu [97-101], što implicira moguću vezu između MTHFR polimorfizama i poremećaja funkcije štitnjače. Arakawa i suradnici dokazali su značajnu povezanost varijante C677T s hipotireozom [95], dok Hustad i suradnici ističu kako varijante *MTHFR* gena mogu povećati rizik od poremećaja štitnjače [93]. Do danas je provedeno nekoliko studija [90,92,93,95-97,100,101] koje su istraživale potencijalnu povezanost polimorfizama gena *MTHFR* i bolesti štitnjače, uključujući Hashimotov tireoiditis, Gravesovu bolest, kao i subkliničke i očite oblike hipo i hipertireoze. Međutim, rezultati tih istraživanja ostaju kontroverzni i nedosljedni. Razlike u dizajnu studija, etničkom podrijetlu ispitanika, veličini uzorka te definiciji i dijagnostičkim kriterijima bolesti štitnjače mogli bi pridonijeti toj varijabilnosti. Također, interakcije između genetskih i okolišnih čimbenika dodatno kompliciraju tumačenje rezultata.

1.4 . Metilentetrahidrofolat reduktaza u reproduktivnim zbivanjima

Prethodno spomenuti polimorfizmi *MTHFR* gena povezani su s nizom reproduktivskih poremećaja uključujući habitualne pobačaje, idiopatsku neplodnost, ponavljane neuspjehe implantacije te slabiji odgovor na KOH tijekom liječenja MPO. Brojnim istraživanjima nastoji se objasniti značenje polimorfizama u ovim procesima, no rezultati ostaju za sada neujednačeni [102-119]. Enzim MTHFR ima ključnu ulogu u metabolizmu folata [78-80]. Folat je esencijalan za reproduktivsko zdravlje, iako točni mehanizmi putem kojih abnormalnosti u njegovom metabolizmu dovode do reproduktivskih poremećaja još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Kao mogući posrednik u nastanku reproduktivskih poremećaja navodi se nedostatna metilacija kritičnih metabolita, što može utjecati na pravilnu staničnu diobu [107]. Metabolizam folata posebno je važan u jajniku tijekom folikularnog razvoja, oogeneze, spermatogeneze te ranog razvoja embrija. Učinkovitost folata je dokazana u prevenciji perinatalnih komplikacija, ponajprije defekata neuralne cijevi [118-120]. Iako su brojna ranija istraživanja dovela polimorfizam C677T *MTHFR* gena u vezu s povećanim rizikom od habitualnih pobačaja [104-106,109,110,112], trenutačne smjernice relevantnih stručnih tijela uključujući Europsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju (engl. European Society of Human Reproduction and Embryology - ESHRE), Američko društvo za medicinsku genetiku (engl. American College of Medical Genetics - ACMG) i Američko društvo za opstetriciju i ginekologiju (engl. American College of Obstetricians and Gynecologists - ACOG) ne savjetuju rutinsko testiranje MTHFR polimorfizama u svrhu procjene rizika tromboze niti ponovljenog gubitka trudnoće [121-123]. Iako je blaga hiperhomocisteinemija češće primijećena kod žena s preeklampsijom, abrupcijom posteljice i gubitkom trudnoće, postoje proturječni podaci o njejoj povezanosti s ponovljenim spontanim pobačajima.

Nadalje, u žena s AIT koje se liječe postupcima MPO, prisutnost određenih MTHFR polimorfničkih varijanti mogla bi dodatno narušiti ili mijenjati ishod liječenja. Hiperhomocisteinemija, uzrokovana smanjenom funkcijom MTHFR, može imati štetne učinke na endotel, placentaciju i implantaciju embrija, što u konačnici može smanjiti udio uspješno začetih trudnoća i povećati rizik od spontanih pobačaja u bolesnica s neplodnošću [78,109,110,124-125]. Novija istraživanja ponovno naglašavaju važnost i ulogu polimorfizama MTHFR u kontekstu idiopatske neplodnosti te reproduktivskih neuspjeha tijekom liječenja neplodnosti postupcima MPO [114,127-130]. Znanstveni dokazi povezuju polimorfizam MTHFR C677T s rezervom jajnika, sazrijevanjem oocita i učestalošću aneuploidija u embrijima. Navedeni polimorfizam također je povezan s POI, ponavljanim spontanim pobačajima i ponavljanim neuspjehom implantacije [109,110,114,119,130,131]. U bolesnica u kojih je homocistein u folikularnoj tekućini u granici normalnih vrijednosti, veća je rezerva primordijalnih folikula u jajniku, bolja je kvaliteta oocita i embrija [120,129].

1.4.1. Metilentetrahidrofolat reduktaza i medicinski pomognuta oplodnja

Poznata je ključna uloga folne kiseline tijekom razdoblja intenzivne stanične diobe, osobito u folikularnom i embrionalnom razvoju. Smanjena aktivnost enzima MTHFR negativno utječe na kvalitetu razvoja oocita i embrija. Poremećaji u metilacijskim procesima ključni su za pravilnu ekspresiju gena tijekom gametogeneze i ranog razvoja embrija stoga polimorfizmi MTHFR mogu indirektno utjecati na kvalitetu oocita, embrija i embrionalni razvoj [120,126-130].

Twigt i suradnici smatraju da je učinak folne kiseline najveći tijekom ranih faza razvoja folikula, osobito u nezrelim folikulima koji rastu tijekom hormonske stimulacije jajnika [120]. Iako je veliki broj prethodnih studija istraživao povezanost između MTHFR polimorfizama i ishoda IVF/ICSI postupaka, rezultati su često oprečni i kontradiktorni, uglavnom zbog malih i heterogenih uzoraka ispitanika [120, 127-136]. Rijetka su sustavna istraživanja koja ciljano analiziraju utjecaj aktivnosti MTHFR u slučajevima kombiniranih polimorfizama C677T/A1298C na embriološke i kliničke ishode IVF/ICSI postupaka [128,132]. Pavlik i suradnici navode kako je genotip MTHFR 677TT povezan s boljom OR i većim koncentracijama AMH u serumu, no istodobno pokazuju negativni učinak istog polimorfizma na broj dobivenih oocita tijekom IVF postupka i KOH-a [136]. Retrospektivna kohortna studija Zeng i suradnika, koja je obuhvatila 1173 žene liječene IVF postupkom, pokazala je da je genotip MTHFR 677TT povezan sa smanjenim brojem razvijenih kvalitetnih zametaka i nižim kumulativnim udjelom živorođenosti [127]. Suprotno tome, Simur i suradnici ističu kako polimorfizmi gena za faktor V Leiden, *MTHFR* i protrombin nemaju značajni utjecaj na uspješnost liječenja MPO postupcima [137]. U preglednom članku i meta-analizi

Ledowsky i suradnika, koja je obuhvatila 16 studija o učinku MTHFR polimorfizama na ishode postupaka MPO, utvrđena je povezanost homozigotnog genotipa C677T s većim vrijednostima AMH, neuspjehom implantacije i slabijim odgovorom jajnika na hormonsku stimulaciju [130]. U istom istraživanju žene s polimorfizmom A1298C imale su manji broj folikula i niže vrijednosti E2, dok implantacija nije uspjela kod jednog od četiri embrija homozigotnih za C677T. Lu i suradnici su istraživali učinak kombiniranih polimorfizama 677TT/1298AA (TT/AA) na embriološke i kliničke ishode IVF postupaka [133]. Žene s navedenim genotipom, koji je povezan s najnižom aktivnošću enzima MTHFR, imaju značajno niži udio zrelih jajnih stanica u usporedbi s ispitanicama s genotipom divljeg tipa. Nadalje, zabilježeno je da se sazrijevanje oocita smanjuje proporcionalno s padom enzimске aktivnosti, što je određeno kombinacijom genotipova C677T i A1298C. Genotipovi srednje enzimске aktivnosti (CC/AC, CC/CC, CT/AA i CT/AC) povezani su s nižim udjelom embrija pogodnih za prijenos. Ipak, nisu utvrđene značajne razlike u kliničkim ishodima između žena s genotipom divljeg tipa i onih s kombiniranim genotipovima C677T/A1298C.

Polimorfizmi MTHFR mogu utjecati i na bazalne vrijednosti FSH te na ukupno potrebnu dozu FSH tijekom KOH [119,128]. Metaanaliza koju su izradili Wang i suradnici pokazala je da polimorfizam MTHFR C677T može utjecati na ove parametre. Naime, bazalne serumske vrijednosti FSH bile su niže u nositelja genotipa CC u usporedbi s nositeljima TT genotipa. Također, žene s genotipom CC stimulirane su nižim dozama FSH od onih s genotipovima CT i TT [128]. Suprotno tome, Rosen i suradnici navode da je polimorfizam MTHFR A1298C, a ne C677T, povezan s većim bazalnim vrijednostima FSH te može biti čimbenik u određivanju odgovora na stimulaciju jajnika [119]. Žene nositeljice varijantnog alela MTHFR 1298C imale su značajno veće bazalne vrijednosti FSH, manji broj folikula većih od 13 mm nakon stimulacije, niže koncentracije E2 na dan primjene hCG-a, te su stimulirane većom dozom gonadotropina. Ova otkrića ukazuju na potencijalnu ulogu polimorfizma MTHFR A1298C u modulaciji folikulogeneze. U žena s varijantom alela MTHFR C677T nisu uočene značajne razlike u ovim parametrima. Shahrokhi i suradnici izvijestili su da prisutnost C alela polimorfizma A1298C korelira s većim vrijednostima AMH, no istovremeno i s manjim brojem aspiriranih jajnih stanica [138]. Enciso i suradnici pokazali su da genotip MTHFR A1298C značajno utječe na smanjenu vjerojatnost začeća. Alel 1298C bio je češći u žena s višestruko neuspješnim MPO ciklusima. Također je utvrđeno da alel MTHFR 677T negativno utječe na implantaciju kromosomski normalnih embrija. Autori predlažu da bi testiranje MTHFR polimorfizama moglo imati kliničku vrijednost u identifikaciji žena s visokim rizikom implantacijskog neuspjeha [132].

Thaler i suradnici su uočili slabiji odgovor jajnika na rekombinantni FSH (r-FSH) tijekom KOH-a u žena koje su nositeljice jednog ili oba rijetka T alela. Ove bolesnice su stimulirane većom dozom r-FSH, a zabilježene su i značajno niže koncentracije estradiola u serumu te manji broj aspiriranih oocita u usporedbi sa ženama koje nisu nositeljice T alela [134]. U novijoj studiji, Sangavi i suradnici ističu *MTHFR* gen kao kandidat za ulogu u folikulogenezi i razvoju jajnika. Autori navode kako *MTHFR* polimorfizmi mogu biti povezani s kromosomskim nerazdvajanjem, osobito u žena s monosomijom X. Također, polimorfizmi utječu na vrijednosti progesterona, razvoj jajnika i folikularnu rezervu te se dovode u vezu s primarnom amenorejom [139]. Brazilska studija Queiroz D'Elia i suradnika pokazala je negativni učinak polimorfizama *MTHFR* C677T i A1298C na zrelost oocita i kvalitetu zametaka. Posebice je zabilježen negativan utjecaj alela A1298C na navedene parametre u bolesnica liječenih MPO postupcima [140]. Utjecaj polimorfizma *MTHFR* C677T na kvalitetu embrija i udio trudnoća nakon MPO postupaka ostaje nejasan što ukazuje na potrebu za daljnjim studijama koje bi uključile veće uzorke ispitanica, standardizirane metodologije i razmatranje dodatnih čimbenika koji mogu utjecati na ishod liječenja neplodnosti.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Polazišna hipoteza ovog istraživanja jest da AIT negativno utječe na ishode KOH-a, te da bolesnice koje nose MTHFR polimorfizme (C677T i/ili A1298C) u homozigotnom ili heterozigotnim oblicima, imaju slabiji ovarijski odgovor tijekom KOH u usporedbi s bolesnicama bez ispitivanih polimorfizama. Također se pretpostavlja da kombinacija AIT i MTHFR polimorfizama dodatno povećava rizik za slabiji odgovor jajnika na stimulaciju gonadotropinima.

Sukladno tome, glavni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi predstavlja li AIT neovisan negativan čimbenik koji utječe na ishode KOH-a ili je njegov učinak ovisan o ovarijskoj rezervi (OR), te ispitati povezanost između prisutnosti AIT-a i MTHFR polimorfizama te rizika za slabiji odgovor jajnika tijekom KOH-a.

Specifični ciljevi istraživanja su sljedeći:

1. a. usporediti srednje vrijednosti spolnih hormona, hormona štitnjače i antitijela štitnjače u definiranim skupinama/podskupinama ispitanica
b. usporediti srednju vrijednost ukupnog broja aspiriranih oocita;
c. usporediti udio zrelih oocita (MII) u odnosu na ukupni broj aspiriranih oocita
d. usporediti udio nezrelih i atretičnih oocita u odnosu na ukupni broj aspiriranih stanica
e. odrediti udio oplodjenih oocita (postotak oplodnje) od broja oocita odabranih za oplodnju
f. odrediti udio zametaka u razvoju 3. dan i 5. po fertilizaciji od broja oocita odabranih za oplodnju
g. testirati razlike od a.-f. između tri grupe ispitanica
2. Utvrditi učestalost genotipova i alela dva polimorfna mjesta *MTHFR* gena (C677T i A1298C) u skupinama ispitanica s AIT (AIT-1 i AIT-2).
3. Utvrditi postoji li razlika u odgovoru jajnika na stimulaciju gonadotropinima između AIT-1 i AIT-2 skupine s obzirom na učestalost genotipova i alela polimorfizama *MTHFR* gena na temelju vrijednosti iz točke 1. (b., c., e., f.)

3. ISPITANICE I METODE

3.1. Plan istraživanja

Početni dio istraživanja obuhvaća retrospektivnu analizu podataka iz medicinske dokumentacije pacijentica koje su liječene postupkom kontrolirane ovarijske hiperstimulacije (KOH) na Zavodu za humanu reprodukciju Kliničkog bolničkog centra u Rijeci (razdoblje 2018.-2023., N = 341).

Za sve uključene ispitanice retrospektivno su iz medicinske dokumentacije Zavoda za humanu reprodukciju i bolničkog informatičkog sustava - IBIS, prikupljeni slijedeći podaci: koncentracija Anti-TPO protutijela; koncentracija Anti-Tg protutijela; serumske koncentracije spolnih hormona (AMH, FSH, LH, E2) te podaci o tijeku i odgovoru jajnika na KOH, definirani sukladno aktualnim ESHRE smjernicama [141]. Na temelju prikupljenih podataka o Anti-TPO i/ili Anti-Tg u ispitanica je potvrđen ili isključen AIT. Na temelju serumskih koncentracija AMH procijenjena je očuvana ili smanjena OR u ispitanica [142]. Skupina ispitanica s AIT je dodatno podijeljena u dvije podskupine: AIT-1 skupinu s normalnom OR (N=120) i AIT-2 skupinu sa smanjenom OR (N=71).

U prospektivnom dijelu istraživanja u ispitanica s AIT N=143 (AIT-1 i AIT-2) su uz sve prethodno navedene podatke, prikupljeni uzorci periferne krvi za genotipizaciju MTHFR polimorfizama te analizirani podaci o tijeku i odgovoru jajnika na KOH.

3.2. Ispitanice

U istraživanje su uključene bolesnice koje su se zbog neplodnosti liječile postupkom KOH na Zavodu za humanu reprodukciju Kliničkog bolničkog centra u Rijeci od 2018. do 2023. godine. U dijagnostičkom postupku utvrđivanja neplodnosti svim pacijenticama je uzeta osobna i ginekološka anamneza te su osim ginekološkog pregleda određene serumske koncentracije spolnih hormona (FSH, LH, AMH, E2) te koncentracije TSH, Anti-TPO i Anti-Tg.

Na osnovi serumskih vrijednosti mikrosomskih i tireoglobulinskih protutijela ispitanice su bile podijeljene u skupinu s autoimunim oboljenjem štitnjače (pozitivna Anti-TPO i/ili Anti-Tg) i kontrolnu skupinu bez AIT (negativna Anti-TPO i Anti-Tg). Na temelju serumskih koncentracija AMH procijenjena je očuvana ili smanjena OR u ispitanica [142] te su ispitanice s AIT podijeljene u dvije podskupine: AIT-1 i AIT-2.

Na osnovi ovih podataka formirane su skupine ispitanica (Slika 2) :

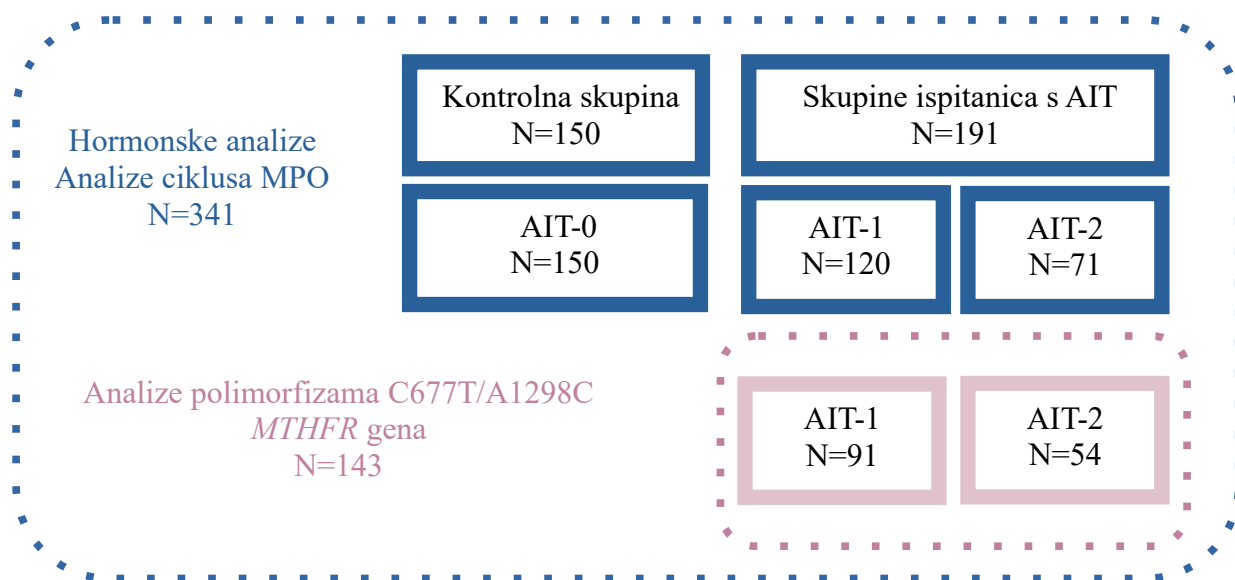
1. Skupina neplodnih ispitanica s AIT (N=191)

- Uključni kriterij: neplodne ispitanice u kojih je potvrđeno autoimuno oboljenje štitnjače (pozitivna Anti-TPO i/ili Anti-Tg); životna dob mlađa od 38 godina.
- Na temelju procjene OR (serumske vrijednosti AMH, FSH, E2) prethodna skupina ispitanica s AIT je podijeljena u dvije podskupine:
 - ispitanice s očuvanom OR (AIT1, N=120)
 - ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom (AIT2, N=71).
- Prospektivno obuhvaćenim ispitanicama s AIT (AIT-1 i AIT-2, N=143) je istraživanje dodatno obuhvatilo određivanje učestalosti alela i genotipova varijanti sekvence MTHFR gena te su analizirani podaci o tijeku i odgovoru jajnika na KOH.

2. Kontrolna skupina neplodnih ispitanica bez AIT (N=150)

- Uključni kriterij: neplodne ispitanice s negativnim Anti-TPO i Anti-Tg; životna dob mlađa od 38 godina
- Sve ispitanice kontrolne skupine su imale normalnu OR (procijenjenu na temelju serumskih vrijednosti AMH, FSH, E2).

Isključni kriteriji za sudjelovanje u istraživanju bili su: dijagnoza udruženih autoimunih bolesti koje mogu utjecati na fertilitet (sistemski eritemski lupus, reumatoidni artritis, idiopatska trombocitopenijska purpura, antifosfolipidni sindrom, autoimuni hepatitis, celijakija, dijabetes tip I, vitiligo, primarna bilijarna ciroza), prethodno dijagnosticirani sindrom policističnih jajnika, prethodno dijagnosticirana endometrioza te starosna dob iznad 38 godina.



Slika 2. Dijagram tijeka istraživanja

plavo-retrospektivni dio istraživanja, ljubičasto-prospektivni dio istraživanja

N broj, AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, MPO medicinski pomognuta oplodnja; MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza

3.3. Metode

3.3.1. Analiza baze medicinskih podataka

Svim ispitanicama retrospektivno su iz medicinske dokumentacije Zavoda za humanu reprodukciju i bolničkog informatičkog sustava IBIS, prikupljeni slijedeći podaci: koncentracija Anti-TPO i Anti-Tg; serumske koncentracije spolnih hormona (AMH, FSH, LH, E2) i TSH. Za sve ispitanice prikupljeni su podaci o tijeku i odgovoru jajnika na KOH, definirani sukladno aktualnim ESHRE smjernicama - Vienna consensus [141]. Analiziran je broj aspiriranih oocita nakon standardne KOH, udio oocita u metafazi II (MII) nakon aspiracije folikula, udio nezrelih i atretičnih oocita, srednji broj oplođenih oocita i udio oplodnje nakon konvencionalne IVF ili ICSI oplodnje. Razvoj embrija, postotak razvijenih embrija 3. dana (68 ± 1 h) i postotak rastućih blastocista 5. i/ili 6. dana (116 ± 2 h i/ili 140 ± 2 h) nakon oplodnje izračunati su na temelju broja MII oocita koje su izabrane za oplodnju [141]. U skladu s nacionalnim zakonodavstvom, oplođeno je maksimalno do 12 jajnih stanica po ciklusu, dok su prekobrojne jajne stanice kriopohranjene za buduće MPO postupke.

Sve ispitanice liječene su fleksibilnim antagonističkim protokolom stimulacije jajnika od 2. ili 3. dana menstruacijskog ciklusa. Rekombinantni FSH ili visoko pročišćeni humani menopauzalni go-

nadotropin- hMG aplicirani su svakodnevno subkutano. Uobičajena doza primijenjenog gonadotropina bila je 150-225 IU/dan. Transvaginalnim ultrazvukom je praćen rast folikula i endometrija od 7.-8. dana ciklusa prema uobičajenom protokolu. Kada su folikuli dosegli srednju veličinu (promjer od 13-15 mm), primjenjene su svakodnevno injekcije antagonista gonadotropin oslobađajućeg hormona (GnRH). Rekombinantni korionski gonadotropin primijenjen je na dan kada su najmanje tri vodeća folikula imala promjer od 17 mm ili ukoliko je jedan folikul postigao promjer 18 mm. Nakon 34-36 sati, učinjena je aspiracija folikula (aspiracijska igla s jednim lumenom) pod ultrazvučnom kontrolom. Folikularne tekućine s aspiriranim oocitama su predane na daljnje postupanje u Laboratorij za biologiju reprodukcije.

Embriolozi su korištenjem stereomikroskopa odmah pregledavali folikularne tekućine i izdvajali komplekse kumulus-oocita (COC). Izolirani COC-i prebačeni su u Petrijevu zdjelicu s kapacitiranim medijem i pohranjeni u ovlaženom CO₂ inkubatoru s konstantnom vrijednošću temperature i koncentracijom CO₂ (37 °C i 6% CO₂). Sazrijevanje oocita pripremljenih za konvencionalnu IVF oplodnju procijenjeno je u trenutku preuzimanja COC-a brzim širenjem kumulusnih stanica i promatranjem prisutnosti prvog polarnog tijela pod povećanjem mikroskopa od 200x, dok su oocyte pripremljene za oplodnju ICSI postupkom procijenjene nakon njihovog ogoljavanja iz COC-a. Oocita je ocijenjena zreloom ako je polarno tjelešće bilo ekstrudirano iz citoplazme oocyte u perivitelin-ski prostor, što je dokaz stadija metafaze II (MII) prve mejotičke diobe.

Nezrele oocyte u stadiju germinativnih vezikula (GV) i atretične ili deformirane oocyte nisu odabrane za oplodnju, odbačene su i uništene. Oplodnja je obavljena 36-40 sati nakon aspiracije oocita. Metoda oplodnje definirana je na temelju parametara koncentracije, pokretljivosti i morfologije spermija nakon pripreme sjemena partnera.

Dokaz oplodnje oocita - prisutnost dvaju pronukleusa, procijenjen je stereomikroskopom 16-18 sati nakon postupka oplodnje. Abnormalna oplodnja je definirana nalazom jednog ili više od dva pronukleusa i takve zigote su odbačene i uništene. Razvijeni rani embriji procijenjeni su drugog (44 ± 1 h) i trećeg dana (68 ± 1 h) nakon oplodnje i kvalificirani su prema morfološkim karakteristikama na temelju Vienna konsenzusa [141]. Blastociste su ocjenjivane petog i/ili šestog dana ($116 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ i/ili $140 \pm 2 \text{ h}$) nakon oplodnje prema Gardnerovim kriterijima [143].

3.3.2. Kemiluminiscentne metode

Koncentracija FSH, LH, E2 i AMH određena je na uređaju Roche cobas 6000 e601 (Roche diagnostics, Mannheim, Njemačka). Spolni hormoni FSH, LH i AMH određeni su elektrokemiluminiscentnom imunokemijskom metodom prema sendvič principu u kojoj se analit iz uzorka veže između dva specifična monoklonska protutijela od kojih je jedno obilježeno biotinom, a drugo rutenijem.

U drugoj se fazi reakcije biotin iz nastalog kompleksa veže na streptavidinom obložene mikročestice pri čemu se stvaraju kompleksi. Ovakve mikročestice se magnetski vežu na elektrodu gdje se pod utjecajem napona na elektrodi inducira kemiluminiscentna reakcija koja se mjeri s obzirom na kalibracijsku krivulju. Visina signala izravno je proporcionalna koncentraciji analita u uzorku.

Estradiol je određen elektrokemiluminiscentnom imunokemijskom metodom prema principu kompeticije. Estradiol iz uzorka veže se između dva monoklonska antitijela iz reagensa obilježena biotinom pri čemu se stvaraju imunokompleksi čija koncentracija ovisi o koncentraciji E2 u uzorku. Dodatkom derivata E2 iz reagensa koji je obilježen rutenijem te streptavidinom obilježenih mikročestica dolazi do vezanja na preostala slobodna mjesta na monoklonskim antitijelima obilježenim biotinom te stvaranja makrokompleksa putem biotin-streptavidin interakcija. Mikročestice se magnetski vežu na elektrodu gdje se pod utjecajem napona na elektrodi inducira kemiluminiscentna reakcija koja se mjeri s obzirom na kalibracijsku krivulju. Visina signala obrnuto je proporcionalna koncentraciji estradiola u uzorku. Koncentracija Anti-Tg, Anti-TPO i TSH određena je na uređaju Siemens Atellica IM1600 (Siemens Healthcare Diagnostics, Dublin, Irska). Antitireoglobulinska antitijela se određuju akridinij-ester-kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom koristeći humani Tg obilježen akridinij-esterom i tireoglobulin obilježen biotinom. Antitireoglobulinska antitijela iz uzorka vežu se za obje vrste Tg formirajući velike komplekse. Biotin iz jednog od obilježenih Tg veže se sa streptavidinom obloženim magnetskim mikročesticama koje su imobilizirane.

Nakon ispiranja suviška Tg inducira se kemiluminiscentna reakcija akridinij-estera čiji je intenzitet izravno proporcionalan koncentraciji Anti-Tg u uzorku. Antitijela na TPO se određuju kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom prema principu kompeticije. Antitijela na TPO iz uzorka natječu se s mišjim monoklonskim Anti-TPO kovalentno vezanim za magnetske mikročestice za ograničenu količinu humane TPO u kompleksu s mišjim monoklonskim Anti-TPO obilježenim akridinij-esterom. Intenzitet kemiluminiscentne reakcije obrnuto je proporcionalan koncentraciji Anti-TPO u uzorku.

Tiroidni stimulirajući hormon se određuje trećom generacijom imunokemijskih testova koristeći anti-FITC (fluorescein izotiocijanat) monoklonsko antitijelo kovalentno vezano na magnetske mikročestice. Mišje monoklonsko antitijelo na TSH obilježeno FITC veže se za TSH iz uzorka te time imobilizira TSH na mikročestice. Drugo mišje monoklonsko antitijelo na TSH konjugirano s goveđim serumskim albuminom i obilježeno akridinij-esterom veže se na imobilizirani TSH iz uzorka. Nakon ispiranja suviška reagensa intenzitet kemiluminiscentne reakcije izravno je proporcionalan koncentraciji TSH u uzorku.

3.3.3. Genotipizacija polimorfizama metilentetrahidrofolat reduktaze

Prospektivno uključenim ispitanicama s AIT (AIT-1 i AIT-2, N = 143) su se, uz sve prethodno navedene podatke u retrospektivnom dijelu istraživanja, venepunkcijom prikupili i uzorci periferne krvi (3 - 5 ml) za genotipizaciju MTHFR polimorfizama. Genomska DNK izolirana je iz leukocita periferne krvi ispitanica. Izolacija je provedena standardnim protokolom prema uputama proizvođača (Qiagen FlexiGene DNA kit, Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka) te je uskladištena na -20°C do daljnje upotrebe. Koncentracija i čistoća DNK određene su spektrofotometrom prema postupniku proizvođača (Thermo Scientific BioMate 3, Thermo Electron Scientific Instrument Corporation, Madison, SAD), a iznosile su 350-800 ng/μL, odnosno A260/280=1,8-2,2 i A260/230>1.

Za genotipizaciju MTHFR C677T i A1298C polimorfizama korištena je kombinacija metoda lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction* - PCR) i polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism* - RFLP). Sljedovi nukleotida specifičnih početnica i veličine PCR produkata korištenih za analizu MTHFR polimorfizama prikazani su u tablici 2., sadržaj PCR reakcijskih smjesa u tablici 3., a uvjeti PCR reakcija u tablici 4. Umnažanje ciljnih odsječaka DNA molekule provedeno je u uređajima za PCR (Mastercycle personal, Eppendorf, Hamburg, Njemačka i 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD), u ukupnom volumenu od 15 μL (Tablica 3). Nakon PCR reakcije, uslijedilo je cijepanje PCR produkata odgovarajućim restrikcijskim enzimima, prema uputama proizvođača (New England Biolabs, Ipswich, MA, SAD). Sadržaj reakcijskih smjesa korištenih za restrikciju MTHFR polimorfizama, vrste restrikcijskih enzima, uvjeti restrikcije i veličine restrikcijskih fragmenata prikazane su u tablicama 5. i 6.

Za razdvajanje dobivenih PCR produkata i restrikcijskih fragmenata korištena je metoda elektroforeze u trajanju od 45 min na 85V, na 1% i 3% agaroznom gelu u koji je dodano 15 μL GelRed™ (Olerup SSP®, Saltsjöbaden, Švedska). Rezultati su vizualizirani pod ultraljubičastim svjetlom transiluminatora. Za određivanje veličine PCR produkata i restrikcijskih fragmenata primjenjivao se DNA standard veličine 50 i 100 bp. Za provjeru vjerodostojnosti rezultata, 10% svih uzoraka je nasumično ponovljeno.

Sadržaj reakcijskih smjesa korištenih za restrikciju MTHFR polimorfizama, vrste restrikcijskih enzima, uvjeti restrikcije i veličine restrikcijskih fragmenata prikazane su u tablicama 5. i 6.

Za razdvajanje dobivenih PCR produkata i restrikcijskih fragmenata korištena je metoda elektroforeze u trajanju od 45 min na 85V, na 1% i 3% agaroznom gelu u koji je dodano 15 μL GelRed™ (Olerup SSP®, Saltsjöbaden, Švedska). Rezultati su vizualizirani pod ultraljubičastim svjetlom transiluminatora. Za određivanje veličine PCR produkata i restrikcijskih fragmenata primjenjivao se

DNA standard veličine 50 i 100 bp. Za provjeru vjerodostojnosti rezultata, 10% svih uzoraka je nasumično ponovljeno.

Tablica 2. Slijedovi nukleotida specifičnih početnica i veličine PCR produkata korištenih za analizu MTHFR polimorfizama.

Polimorfizam	Početnice	PCR produkt (bp)
MTHFR C677T	5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' 5'-CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA-3'	198
MTHFR A1298C	5'CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTA3' 5'CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG3'	163

MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza, bp parovi baza (eng. *base pairs*), PCR lančana reakcija polimerazom

Tablica 3. Sadržaj PCR reakcijske smjese za analizu MTHFR C677T i A1298C polimorfizama

	MTHFR C677T rs1801133	MTHFR A1298C rs1801131
10 × PCR pufer	1,5 µl	1,5 µl
25 mM MgCl	1,5 µl	1,8 µl
10 mM dNTP	0,3 µl	0,15 µl
Uzvodna početnica	1,2 µl	0,6 µl
Nizvodna početnica	1,2 µl	0,6 µl
bidestilirana voda	8,65 µl	9,7 µl
Taq polimeraza	0,15 µl	0,15 µl
DNK	0,5 µl	0,5 µl
Ukupni volumen reakcijske smjese	15 µl	15 µl

PCR lančana reakcija polimerazom, MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza, MgCl Magnezijev klorid, dNTP Deoksinukleotid, DNK deoksiribonukleinska kiselina

Tablica 4. Uvjeti PCR reakcija za analizu MTHFR polimorfizama

Broj ponavljanja	Korak	MTHFR C677T Temperatura / Trajanje	MTHFR A1298C Temperatura / Trajanje
1	Početna denaturacija	94 °C / 2 min	92 °C / 2 min
40	Denaturacija	94 °C / 30 s	92 °C / 60 s
	Sparivanje početnica	62 °C / 30 s	60 °C / 60 s
	Produljivanje lanaca	72 °C / 30 s	72 °C / 30 s
1	Završno produljivanje lanaca	72 °C / 7 min	72 °C / 7 min

MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza, PCR lančana reakcija polimerazom

Tablica 5. Sadržaj reakcijskih smjesa za restrikciju polimorfizama gena *MTHFR*

	MTHFR C677T	MTHFR A1298C
Restrikcijski enzim	0,2 µl	0,2 µl
CutSMart pufer	2,0 µl	2,0 µl
bidestilirana voda	7,8 µl	7,8 µl
PCR produkt	10,0 µl	10,0 µl
Ukupno	20,0 µl	20,0 µl

MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza, PCR lančana reakcija polimerazom

Tablica 6. Vrste restrikcijskih enzima, uvjeti restrikcije i veličine restrikcijskih fragmenata korištenih za analizu MTHFR polimorfizama

	MTHFR C677T	MTHFR A1298C
Restrikcijski enzim	HinfI	MboII
Uvjeti restrikcije	37 °C / 45 min	37 °C / preko noći
Restrikcijski fragmenti (bp)	C alel: 198 T alel: 175 i 23	A alel: 56, 31/30, 28, 18 C alel: 84, 31/30, 18

MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza, bp parovi baza (eng. *base pairs*)

3.4. Statistička obrada podataka

Statistička analiza provedena je korištenjem R softvera (verzija 4.1.1), uz dodatne pakete iz skupa *tidyverse* te *patchwork* paket za kompoziciju grafova. Dodatne analize podataka izrađene su u računalnom programu Statistica za Windows, verzija 13.3 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD).

Na temelju prethodno objavljenih podataka o frekvencijama ispitivanih genotipova i alela [88,89] te izračuna statističke snage studije od 80%, računalnim programom ClinCalc LLC određena je potrebna veličina uzorka.

Demografske i kliničke karakteristike ispitanica prikazane su deskriptivnom statistikom. Za kategoričke varijable navedene su apsolutne i relativne frekvencije, dok su za numeričke varijable prikazane odgovarajuće mjere središnje tendencije i raspršenja.

Usporedbe između ispitivanih skupina provedene su analizom varijance (ANOVA), pri čemu je vrijednost $p < 0,05$ smatrana granicom statističke značajnosti nakon provedene post hoc prilagodbe. Normalnost distribucije i homogenost varijanci procijenjene su pomoću Shapiro–Wilkovog testa, Leveneovog testa i Q–Q grafova reziduala.

Razlike u kategoričkim varijablama (učestalost genotipova i alela odabranih polimorfizama *MTHFR* gena) između podskupina bolesnika s AIT analizirane su pomoću chi-kvadrat testa (χ^2).

Utjecaj OR i polimorfizama *MTHFR* gena na odgovor jainika tijekom KOH u ispitanica s AIT ispitan je linearnom regresijskom analizom s kategoričkim prediktorom (genotipom). Statistička značajnost određena je na razini 5% ($p < 0,05$). Prikazani koeficijenti predstavljaju razlike u zavisnim varijablama između analiziranih skupina i referentne skupine za svaki genotip.

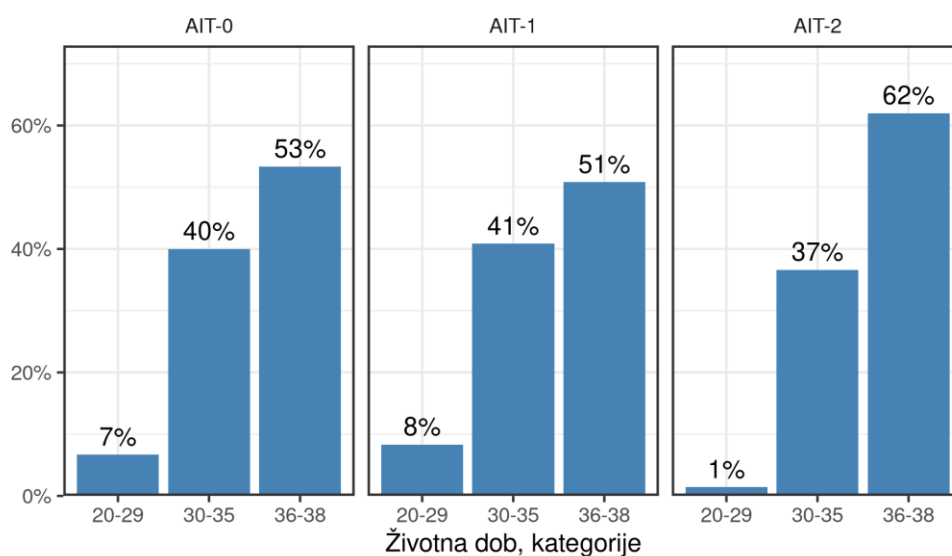
S obzirom na to da su provedene dvije odvojene analize (za AIT-1 i AIT-2), dobiveni rezultati uspoređeni su prema veličini koeficijenata i njihovim 95%-tnim intervalima pouzdanosti. Nakon regresijske analize, kojom su uspoređeni svi genotipovi (CC, CT i TT za polimorfizam C677T, te AA, AC i CC za polimorfizam A1298C) i pojedini ishodi MPO postupka, radi dodatne provjere i interpretacije rezultata najčešćih genskih varijacija provedena je i dodatna analiza nezavisnim t-testom (Welchov t-test), pri čemu je za procjenu veličine učinka korišten Cohenov d.

4. REZULTATI

4.1 Rezultati retrospektivnog istraživanja

4.1.1. Životna dob ispitanica

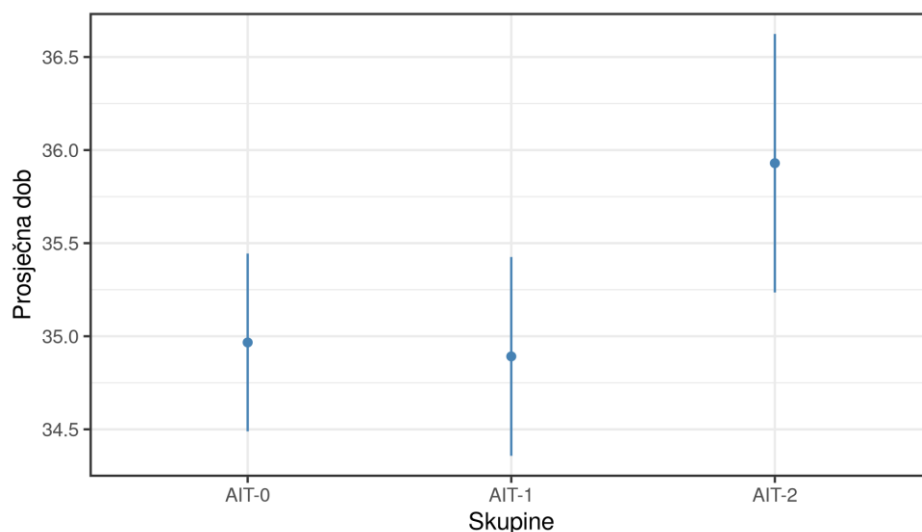
U svim ispitivanim skupinama više od 50% uključenih ispitanica bilo je liječeno u starijoj reprodukcijskoj dobi od 36 do 38 godina. Ispitanice iz te dobne skupine nešto su zastupljenije (62%) u AIT-2 skupini koju osim AIT obilježava i značajno smanjena OR (Slika 3).



Slika 3. Udio ispitanica prema životnoj dobi

AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom

Prosječna životna dob ispitanica iz skupina s AIT nije se značajno razlikovala od prosječne dobi ispitanica iz kontrolne skupine. Životna dob ispitanica iz podskupine AIT-1 i iz podskupine AIT-2 također se nije značajno razlikovala, iako je srednja vrijednost dobi ispitanica u podskupini AIT-2 bila veća u odnosu na skupinu AIT-1 (34.9 vs. 35.9, $p = 0.053$) (Tablica 7, Slika 4).

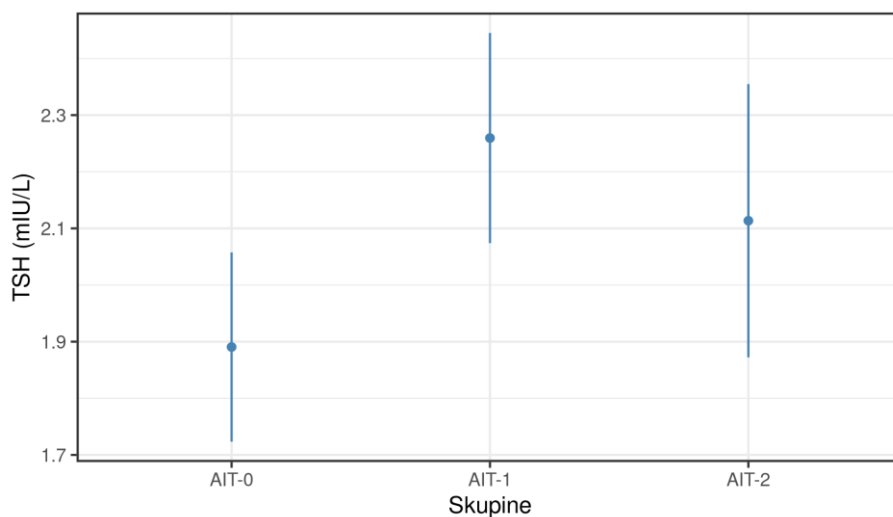


Slika 4. Prosječna dob ispitanica prema skupinama uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)

AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom

4.1.2. Usporedbe vrijednosti tireotropina i spolnih hormona prema podskupinama

Srednja serumska koncentracija TSH bila je u svim podskupinama u granicama normalnog raspona vrijednosti, ali značajno veća samo u podskupini AIT-1 u odnosu na kontrolnu skupinu AIT-0 (2.2 ± 1.2 vs. 1.9 ± 0.7 $p = 0.011$) (Slika 5, Tablica 7).



Slika 5. Prosječna koncentracija TSH uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)

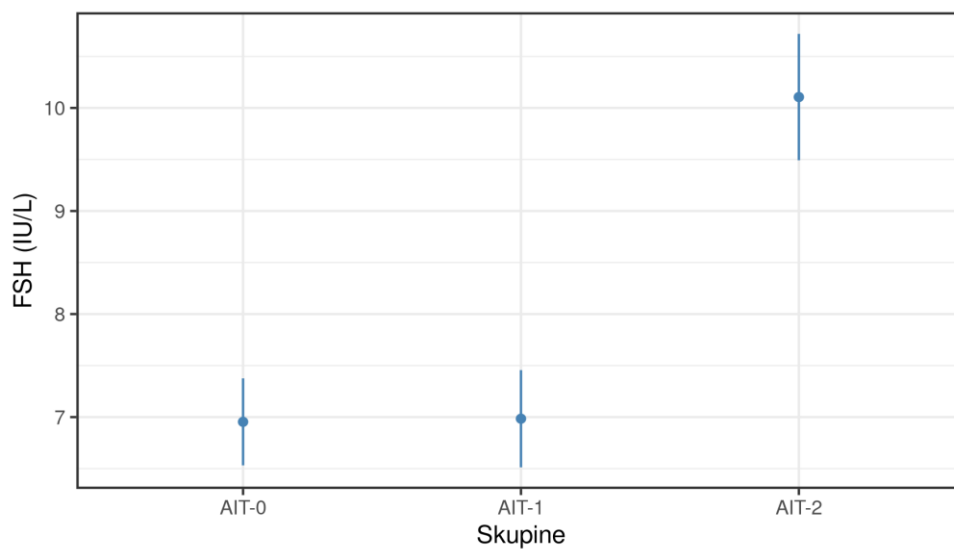
TSH tiroidni stimulirajući hormon-tireotropin, AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom

Na osnovi koncentracija spolnih hormona podskupina AIT-2 se značajno razlikovala u odnosu prema kontrolnoj skupini AIT-0 i AIT-1 podskupini, što smo očekivali na osnovi procijenjene slabije funkcije jajnika u AIT-2 podskupini. U AIT-2 podskupini zabilježena je značajno veća srednja vrijednost koncentracije FSH ($10,2 \pm 4,6$ IU/L) i značajno snižena srednja vrijednost koncentracije AMH ($0,65 \pm 0,33$ ng/mL) što je bilo očekivano i u skladu sa smanjenom OR (Tablica 7, Slika 6, Slika 7). Nisu utvrđene razlike u prosječnoj koncentraciji E2 i LH među studijskim podskupinama (Tablica 7, Slika 8).

Tablica 7. Osnovne karakteristike ispitanica, vrijednosti TSH, spolnih hormona i antitijela štitnjače

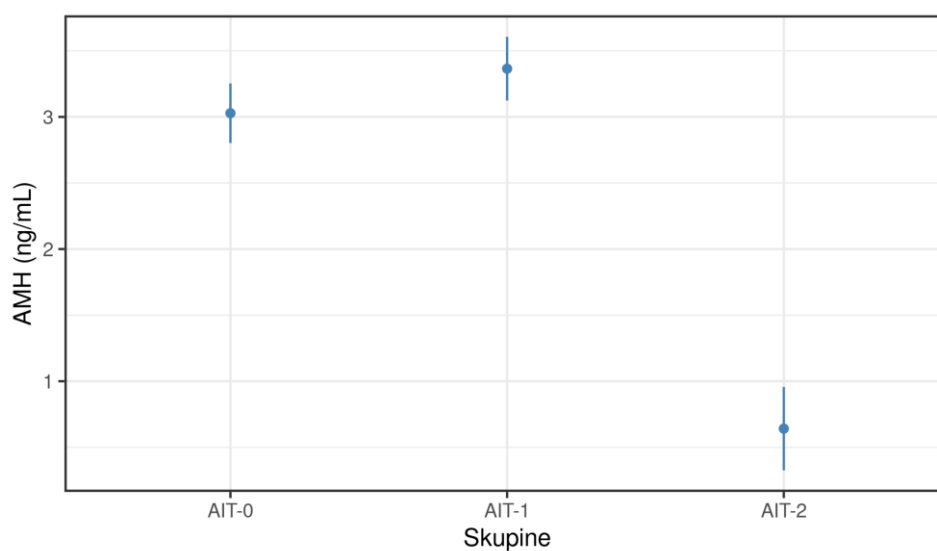
	AIT-0 SV $\pm$ SD (N = 150)	AIT-1 SV $\pm$ SD (N = 120)	AIT-2 SV $\pm$ SD (N = 71)	AIT-1 vs AIT-0 p	AIT-2 vs AIT-0 p	AIT-2 vs AIT-1 p
Dob (god.)	34.9 $\pm$ 3.2	34.8 $\pm$ 3.0	35.9 $\pm$ 2.2	0.977	0.065	0.053
TSH (mIU/L)	1.9 $\pm$ 0.7	2.2 $\pm$ 1,2	2,1 $\pm$ 1,1	0.011*	0.295	0.613
FSH (IU/L)	7.0 $\pm$ 1.4	7.0 $\pm$ 2.0	10.1 $\pm$ 4.7	0.995	<0.001*	<0.001*
LH (IU/L)	6.5 $\pm$ 2.0	6.5 $\pm$ 2.9	6.4 $\pm$ 2.7	0.998	0.881	0.913
E2 (pmol/L)	176.1 $\pm$ 69.7	172.0 $\pm$ 94.7	195.6 $\pm$ 184.8	0.951	0.449	0.338
AMH (ng/mL)	3.0 $\pm$ 1.3	3.4 $\pm$ 1.7	0.6 $\pm$ 0.3	0.112	<0.001*	<0.001*
Anti-TPO (IU/mL)	23.7 $\pm$ 10.7	584.8 $\pm$ 781.3	414.0 $\pm$ 521.4	-	-	0.107
Anti-Tg (IU/mL)	1.3 $\pm$ 0.2	144.6 $\pm$ 224.2	167.8 $\pm$ 219.9	-	-	0.673

N broj, AIT-0 kontrolna skupina AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, TSH tiroidni stimulirajući hormon, FSH folikul stimulirajući hormon, LH luteinizirajući hormon, AMH Anti-Müllerov hormon, Anti-TPO antitijela na tireoidnu peroksidazu, Anti-Tg antitijela na tireoglobulin, * statistički značajna razlika, p <0.05 nivo statističke značajnosti, SV srednja vrijednost, SD standardna devijacija



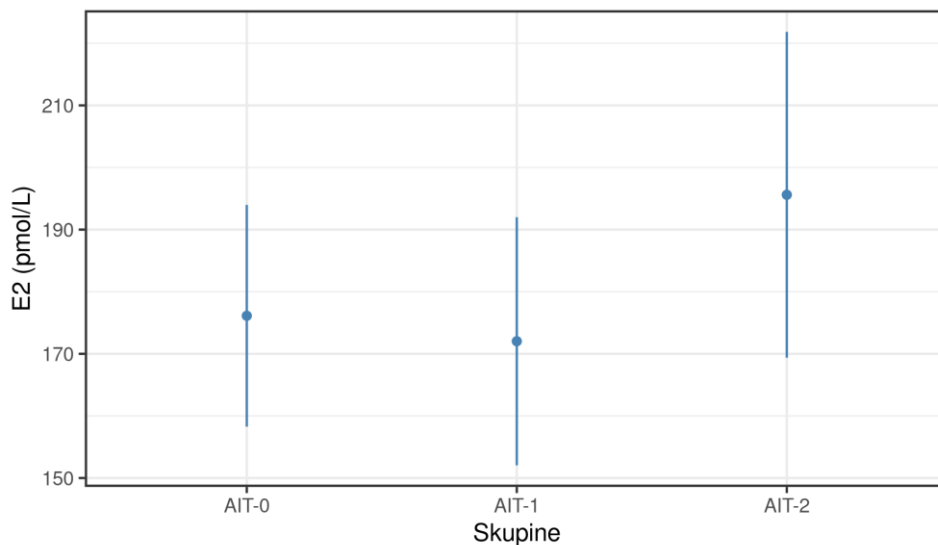
Slika 6. Prosječna koncentracija FSH uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)

FSH folikul stimulirajući hormon, AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom



Slika 7. Prosječna koncentracija AMH uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)

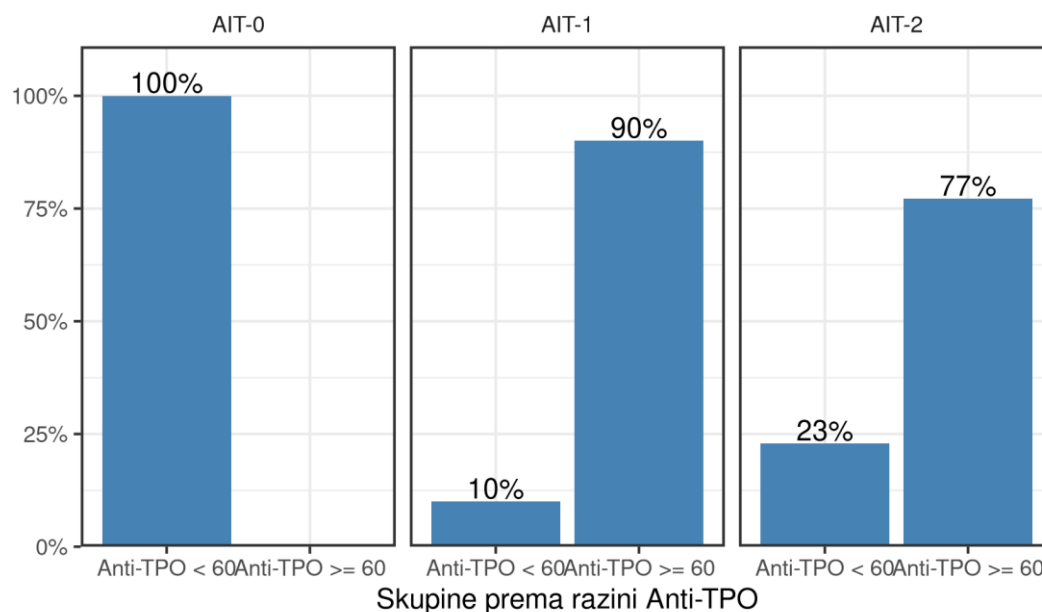
AMH Anti-Müllerov hormon, AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom



Slika 8. Prosječna koncentracija E2 uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)

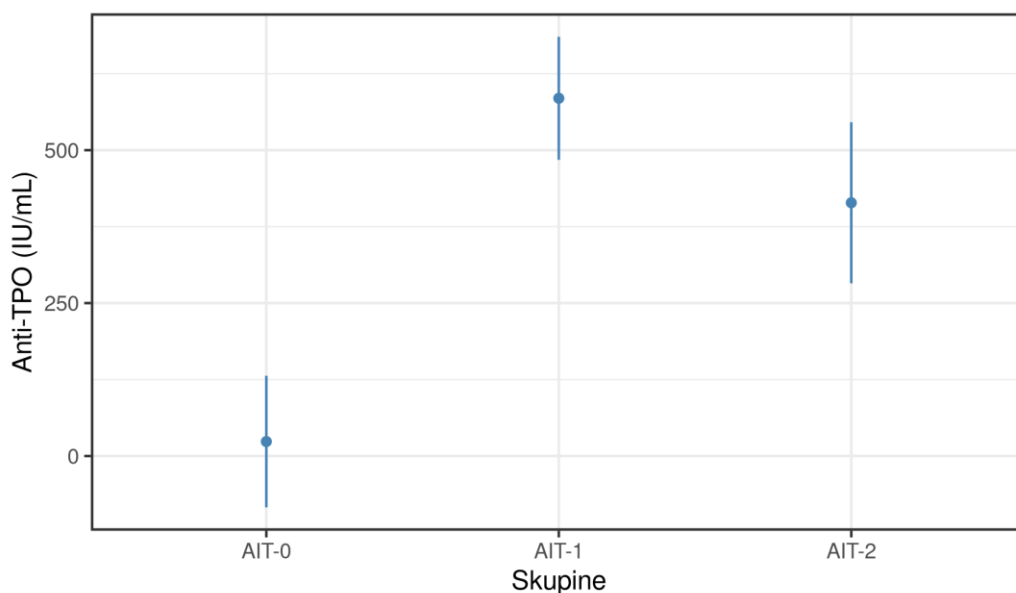
E2 estradiol, AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom

Sve ispitanice u kontrolnoj skupini imale su koncentraciju Anti-TPO unutar graničnih vrijednosti (Slika 9). U podskupini AIT-1 u 10% slučajeva, a u podskupini AIT-2 u 23% slučajeva nalaz protutijela je bio unutar normalnih graničnih vrijednosti. Međutim, budući da su kod svake ispitanice testirana dva protutijela, koncentracija barem jednog protutijela je bila povišena i radi toga se u AIT podskupinama pojavljuje mali udio ispitanica s negativnim nalazom jednog od protutijela. Razlike u proporcijama ispitanica pozitivnih na ATAt testirane su Hi-kvadrat testom. Najveći udio ispitanica pozitivnih na Anti-TPO bio je zabilježen u podskupini AIT-1 (90%) i značajno je veći u odnosu na AIT-2 podskupinu $p = 0.027$ (Slika 9). Prosječne koncentracije Anti-TPO i Anti-Tg protutijela nisu se značajno razlikovale između AIT-1 i AIT-2 podskupina (Tablica 7, Slika 10).



Slika 9. Udio pozitivnih Anti-TPO po podskupinama ispitanica.

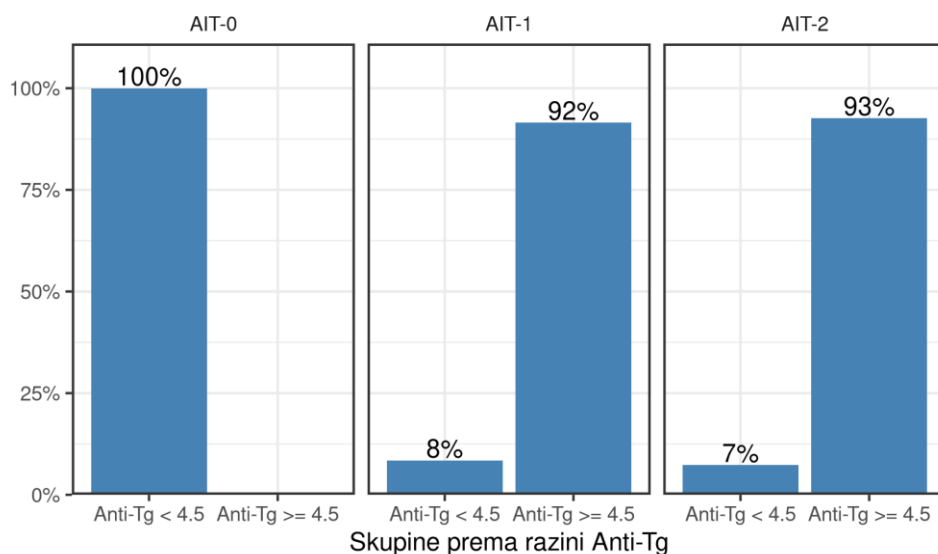
AIT-0 kontrolna skupina AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, Anti-TPO antitijela na tireoidnu peroksidazu



Slika 10. Prosječna koncentracija Anti-TPO uz intervale pouzdanosti (alpha = 95%)

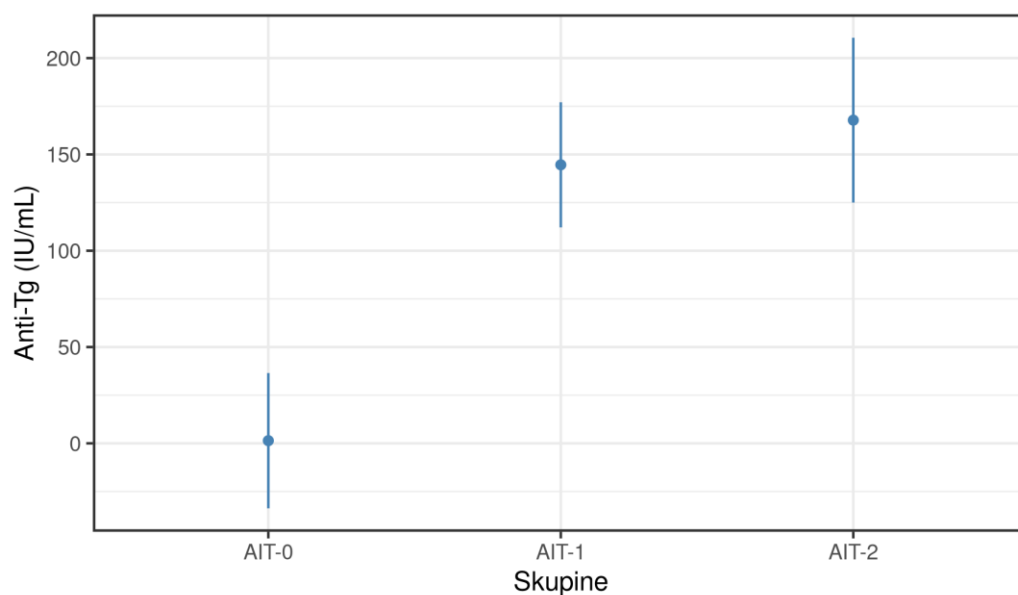
AIT-0 kontrolna skupina AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, Anti-TPO antitijela na tireoidnu peroksidazu

Sve ispitanice iz kontrolne skupine imaju Anti-Tg vrijednost unutar graničnih vrijednosti (Slika 11). U podskupini AIT-1 u 8% slučajeva, a u skupini AIT-2 u 7% slučajeva nalaz je unutar graničnih vrijednosti. Razlike u proporcijama testirane su Hi-kvadrat testom te nije dokazana značajna razlika među podskupinama AIT-1 i AIT-2 (Slika 12).



Slika 11. Udio pozitivnih Anti-Tg po podskupinama.

AIT-0 kontrolna skupina AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, Anti-Tg antitijela na tireoglobulin



Slika 12. Prosječna koncentracija Anti-Tg uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)

AIT-0 kontrolna skupina AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, Anti-Tg antitijela na tireoglobulin

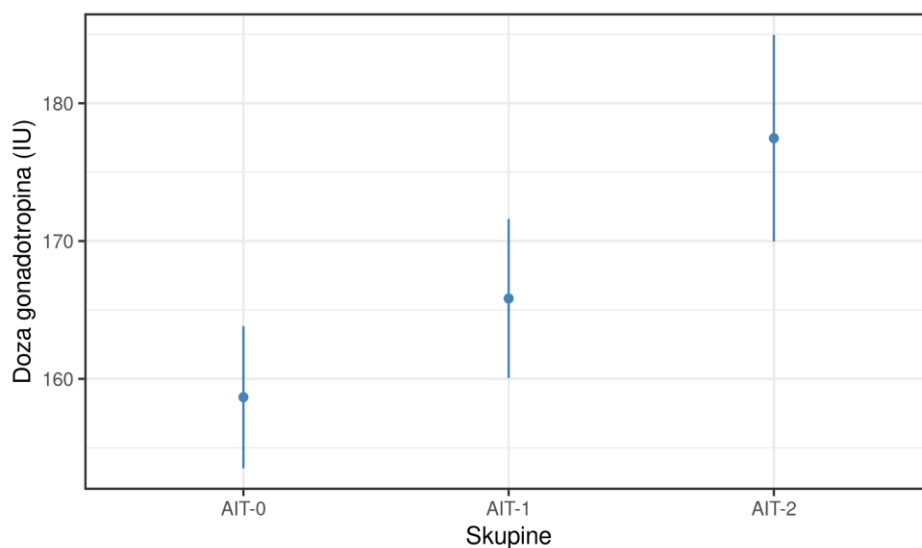
4.1.3. Rezultati ovarijske stimulacije

U Tablici 8. su prikazane srednje vrijednosti doze primjenjenog FSH u protokolima za stimulaciju jajnika. Prosječna primjenjena doza FSH bila je značajno veća u ispitanica AIT-2 podskupine u odnosu na ispitanice kontrolne skupine (177.7 ± 36.5 IU vs. 158.6 ± 27.3 IU, $p < 0.001$) i AIT-1 podskupine (177.7 ± 36.5 IU vs. 165.8 ± 34.7 IU, $p = 0.034$) dok ostale prikazane razlike nisu bile značajne (Tablica 8, Slika 13).

Tablica 8. Doza gonadotropina za stimulaciju jajnika i vrsta oplodnje

	AIT-0 (N = 150)	AIT-1 (N = 120)	AIT-2 (N = 71)	AIT-0 vs AIT-1 p	AIT-0 vs AIT-2 p	AIT-1 vs AIT-2 p
Doza gonadotropina (IU) SV±SD	158.6 ± 27.3	165.8 ± 34.7	177.7 ± 36.5	0.153	<0.001*	0.034*
ICSI oplodnja N (%)	86 (58)	59 (51)	42 (64)	0.383	0.372	0.372
IVF oplodnja N (%)	45 (30)	44 (38)	21 (32)	0.384	0.248	0.205
IVF+ICSI oplodnja N (%)	18 (12)	12 (10)	3 (5)	0.388	0.340	0.274

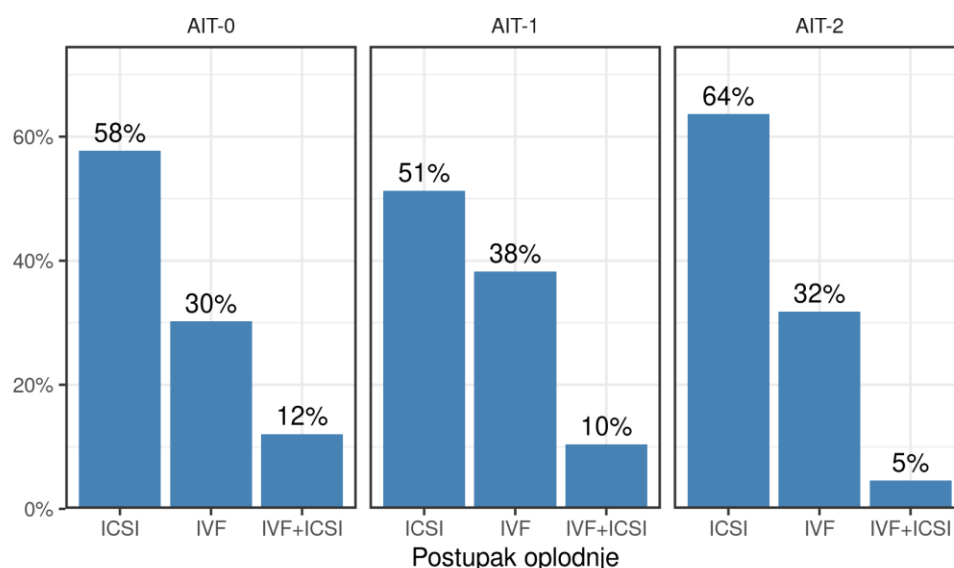
N broj, IU internacionalne jedinice, SV srednja vrijednost, SD standardna devijacija AIT-0 kontrolna skupina AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, IVF *in vitro* fertilizacija, ICSI intracitoplazmatska injekcija spermija, * statistički značajna razlika, p <0.05 nivo statističke značajnosti



Slika 13. Prosječna doza primjenjenog FSH (IU) za stimulaciju jajnika uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)

AIT-0 kontrolna skupina AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom

Slika 14. prikazuje udjele ispitanica ovisno o odabranom načinu oplodnje jajnih stanica u podskupinama. Nije utvrđena statistički značajna razlika u načinu oplodnje između ispitivanih podskupina. U svim podskupinama su najčešće oocyte bile oplodene ICSI postupkom, a najveći udio ovog oblika oplodnje zabilježen je u AIT-2 podskupini (64%). Klasična *in vitro* fertilizacija primjenjena je u oko trećine ispitanica u svim podskupinama, a najveći udio je zabilježen u podskupini AIT-1 (38%) (Tablica 8, Slika 14).



Slika 14. Način oplodnje jajnih stanica u podskupinama.

IVF *in vitro* fertilizacija, ICSI intracitoplazmatska injekcija spermija, AIT-0 kontrolna skupina AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom

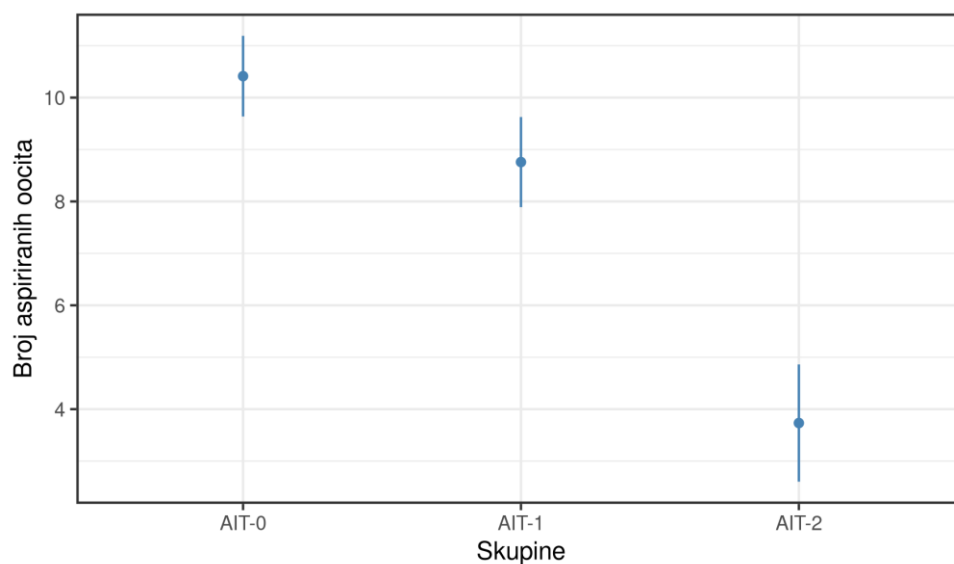
4.1.4. Kvantitativni i kvalitativni pokazatelji ovarijske stimulacije (oocite i zametci)

Prosječni broj ukupno aspiriranih oocita nakon ovarijske stimulacije bio je značajno manji u podskupini AIT-2 ($SV = 3,7 \pm 2,5$, $p < 0.001$) u odnosu na ostale studijske grupe te ujedno očekivan zbog smanjene OR. U podskupini AIT-1 srednja vrijednost broja aspiriranih stanica također je bila manja u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0.015$) (Tablica 9, Slika 15).

Tablica 9. Ishodi ovarijske stimulacije

	AIT-0 SV $\pm$ SD (N = 150)	AIT-1 SV $\pm$ SD (N = 120)	AIT-2 SV $\pm$ SD (N = 71)	AIT-1 vs AIT-0 p	AIT-2 vs AIT-0 p	AIT-1 vs AIT-2 p
Broj oocita (N)	10,4 $\pm$ 4,7	8,8 $\pm$ 6.09	3,7 $\pm$ 2,5	0.015*	<0.001*	<0.001*
Udio MII oocita (%)	84.0 $\pm$ 14.2	73.8 $\pm$ 25.1	74.8 $\pm$ 27.8	<0.001*	0.009*	0.943
Udio MI oocita (%)	2.8 $\pm$ 6.0	9.5 $\pm$ 1.5	4.1 $\pm$ 1.4	0.023*	1.000	0.442
Udio GV oocita (%)	7.2 $\pm$ 9.2	7.5 $\pm$ 1.3	8.0 $\pm$ 1.6	1.000	1.000	1.000
Udio atretičnih oocita (%)	4.9 $\pm$ 7.3	8.5 $\pm$ 1.6	12.7 $\pm$ 2.2	0.768	0.024*	0.813

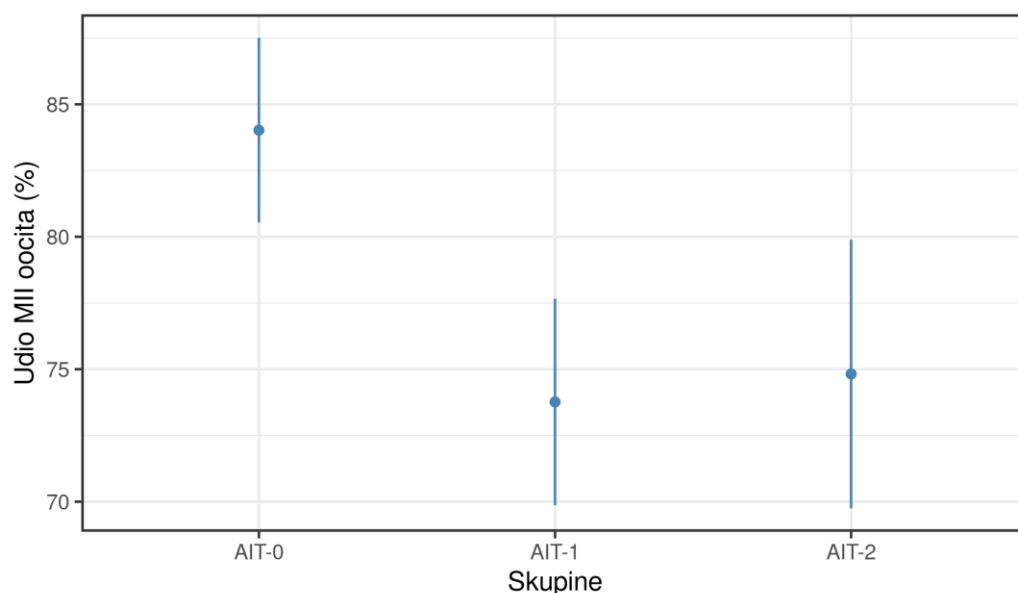
N broj, AIT-0 kontrolna skupina AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, * statistički značajna razlika p <0.05 nivo statističke značajnosti, SV srednja vrijednost, SD standardna devijacija, MII oocite u metafazi II, MI oocite u metafazi I, GV germinativni vezikul



Slika 15. Prosječni broj ukupno aspiriranih oocita uz intervale pouzdanosti (alpha = 95%)

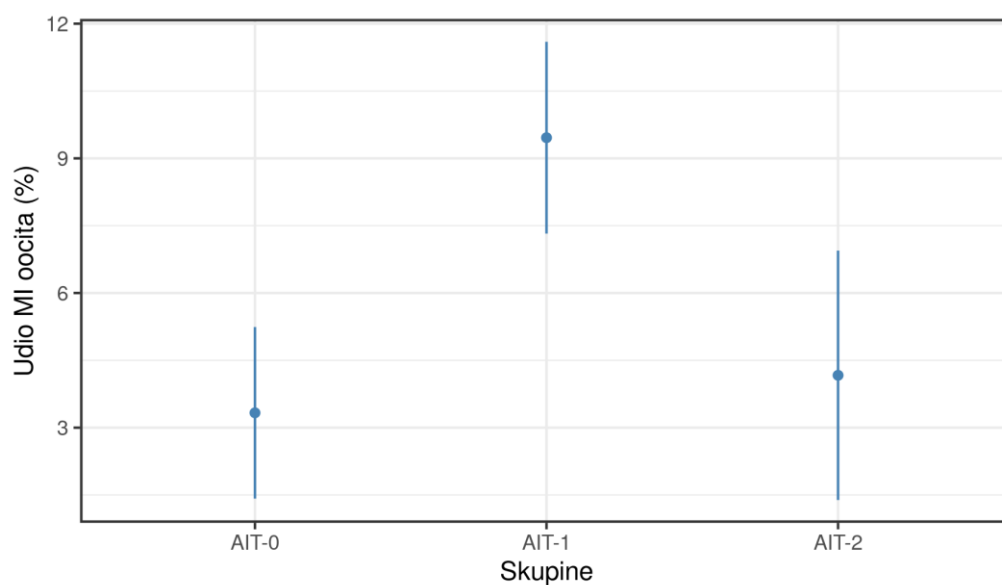
AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom

U svim studijskim podskupinama najzastupljeniji tip stanica nakon KOH su bile zrele oocite – MII, međutim njihov udio je bio značajno manji u podskupinama ispitanica s AIT u odnosu na kontrolnu skupinu AIT-0 (73.8% vs. 84%, $p < 0.001$; $p = 0.009$) (Tablica 9). Nije utvrđena značajna razlika između prosječnog udjela MII oocita u podskupinama ispitanica s AIT (Tablica 9, Slika 16).



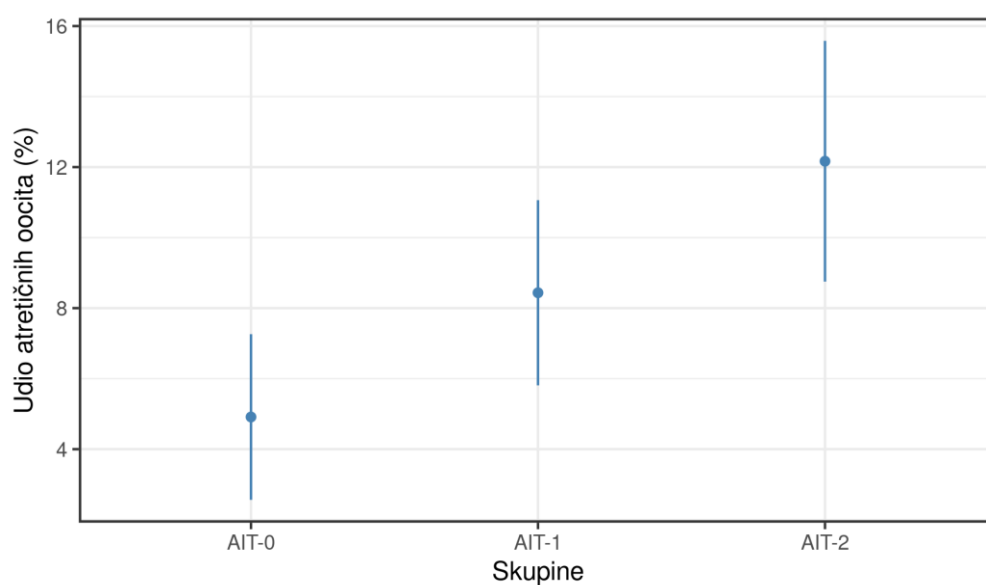
Slika 16. Prosječni udio MII oocita uz interval pouzdanosti ($\alpha = 95\%$) AIT-0 kontrolna skupina AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, MII oocite u metafazi II

Udio stanica koje nisu bile pogodne i nisu korištene za liječenje i oplodnju kretao se u rasponu od 3-12%. Oocite MI (zastale u metafazi I prve mejotičke diobe, nezrele) najvećim udjelom su bile zastupljene u podskupini AIT-1, što se značajno razlikovalo u odnosu na udio nezrelih MI oocita u kontrolnoj skupini (9.5% vs 2.8%; $p = 0.023$). Atretičnih oocita bilo je značajno više u podskupini AIT-2 u usporedbi s kontrolnom skupinom (12.7% vs. 4.9%, $p = 0.024$). Ostale testirane razlike nisu bile statistički značajne (Tablica 9, Slike 17, 18 i 19).



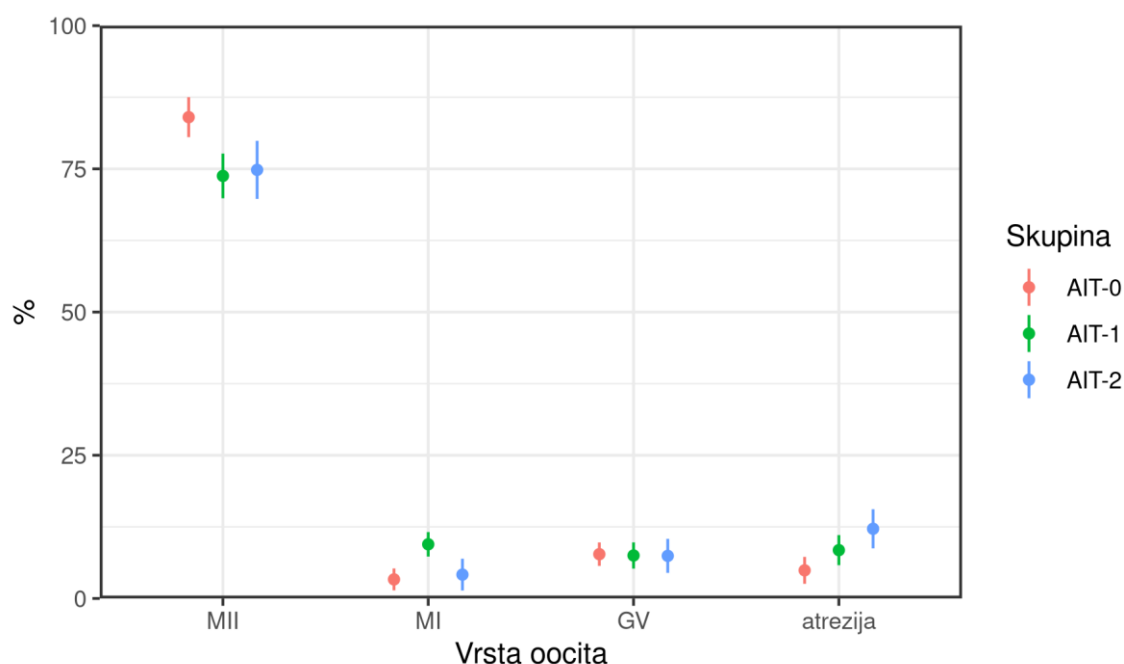
Slika 17. Prosječni udio MI oocita uz interval pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)

AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, MI oocyte u metafazi I



Slika 18. Prosječni udio atretičnih oocita uz interval pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)

AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom

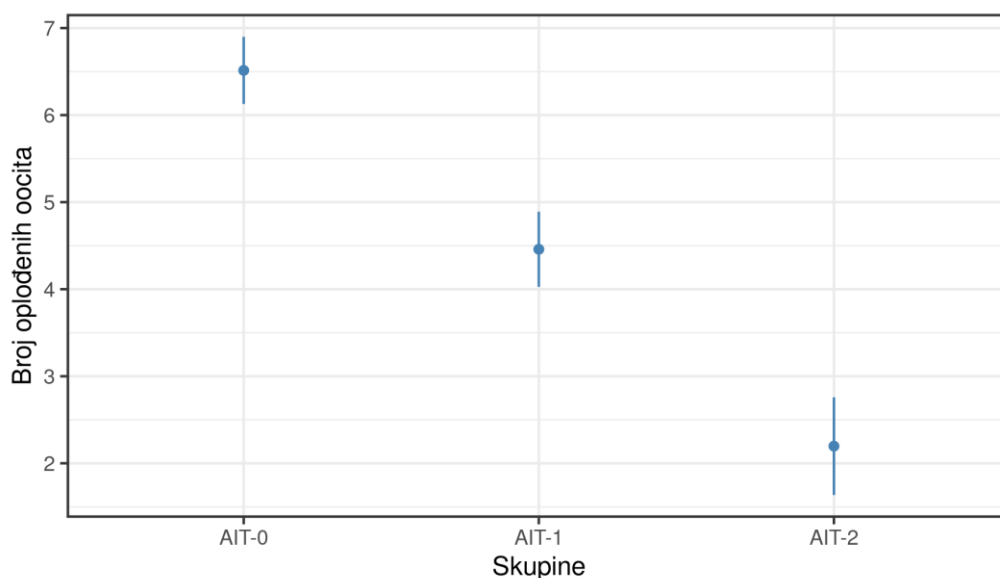


Slika 19. Prosjek udjela pojedinih vrsta oocita u podskupinama uz interval pouzdanosti (alpha = 95%).

AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, MII oocite u metafazi II, MI oocite u metafazi I, GV germinativni vezikul

Razvoj zametaka u kulturi bio je značajno slabiji u obje podskupine ispitanica s AIT u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanica (Tablica 10). Podskupina AIT-1 (očuvana OR) se značajno razlikovala od kontrolne skupine po svim analiziranim kategorijama oplodnje i kulture zametaka. Utvrdili smo značajno slabiju fertilizaciju MII oocita (70.3 ± 29.3 vs. 80.8 ± 15.0 , $p < 0.001$) (Slika 20), te značajno manji udio razvijenih zametaka u kulturi 3. i 5. dan po fertilizaciji (Tablica 10, Slike 21, 22 i 23). Podskupina AIT-2 (smanjena OR), se također značajno razlikovala od kontrolne skupine po značajno manjem broju oplodjenih MII oocita (2.2 ± 1.8 vs. 6.5 ± 2.3 , $p < 0.001$), te značajno manjem udjelu razvijenih zametaka u kulturi 3. i 5. dan po fertilizaciji (Tablica 10, Slike 20, 21, 22 i 23). Zanimljivo je da se oplodnja u AIT-2 podskupini nije razlikovala u odnosu na kontrolnu skupinu. Usporedba razvoja zametaka između podskupina ispitanica s AIT ukazuje na podjednak razvoj zametaka do 3. dana kulture, ali značajno manji razvoj zametaka do stadija blastociste u podskupini AIT-2. Potvrdili smo značajno niži srednji broj dobivenih oocita ($3,7 \pm 2,5$ vs. $8,8 \pm 6,0$, $p <$

0,001) i značajno manje oplodjenih oocita ($2,2 \pm 1,8$ vs. $4,5 \pm 2,8$, $p < 0,001$) u podskupini AIT-2, što odražava razlike u OR među podskupinama s AIT. Štoviše, srednji postotak razvijenih blastocista (na broj MII oocita) i udio blastocista (na broj nastalih zigota) bili su značajno niži u AIT-2 podskupini ($18,0 \pm 30,1$ vs. $26,8 \pm 25,8$, $p = 0,038$ odnosno $21,3 \pm 34,7$ vs. $35,7 \pm 32,5$, $p < 0,002$) (Slika 22). Ostali analizirani parametri nisu se značajno razlikovali između ove dvije podskupine (Tablica 10).



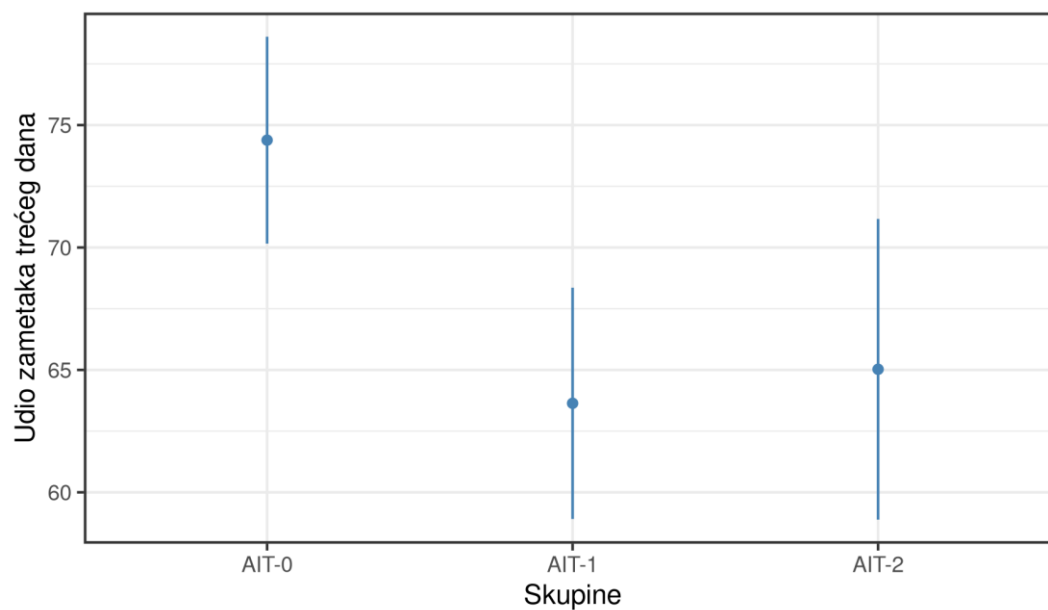
Slika 20. Prosječni broj oplodjenih MII oocita uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)

AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom

Tablica 10: Ishodi oplodnje MII oocita i kulture zametka

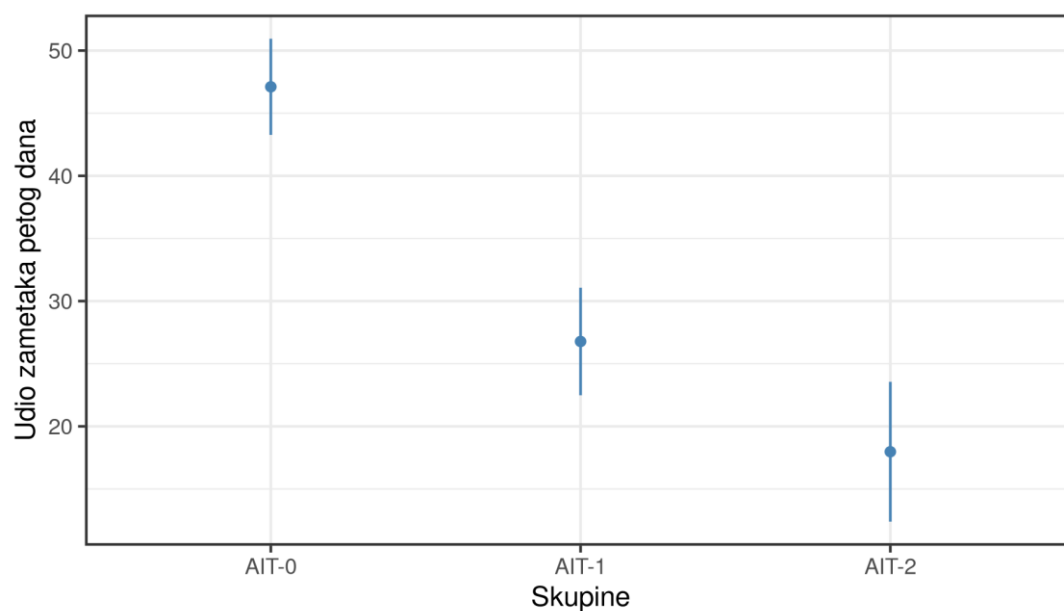
	AIT-0 SV $\pm$ SD (N = 150)	AIT-1 SV $\pm$ SD (N = 120)	AIT-2 SV $\pm$ SD (N = 71)	AIT-1 vs AIT-0 p	AIT-2 vs AIT-0 p	AIT-1 vs AIT-2 p
Oplođene oocite (N)	6.5 $\pm$ 2.3	4.5 $\pm$ 2.8	2.2 $\pm$ 1.8	<0.001*	<0.001*	<0.001*
Udio oplođenih oocita (%)	80.8 $\pm$ 15.0	70.3 $\pm$ 29.3	73.9 $\pm$ 33.1	0.002*	0.139	0.608
Udio zametaka u razvoju (3.dan) na broj MII oocita (%)	74.4 $\pm$ 15.6	63.6 $\pm$ 30.2	65.0 $\pm$ 35.6	0.002*	0.037*	0.933
Udio blastocista na broj MII oocita (%)	47.1 $\pm$ 18.4	26.8 $\pm$ 25.8	18.0 $\pm$ 30.1	<0.001*	<0.001*	0.038*
Udio zametaka u razvoju na broj zigota (%)	92.6 $\pm$ 11.9	84.3 $\pm$ 30.3	79.1 $\pm$ 34.9	0.020*	<0.001*	0.362
Udio blastocisti na broj zigota (%)	58.2 $\pm$ 19.9	35.7 $\pm$ 32.5	21.3 $\pm$ 34.7	<0.001*	<0.001*	0.002*

N broj, AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, * statistički značajna razlika p <0.05, SV srednja vrijednost, SD standardna devijacija



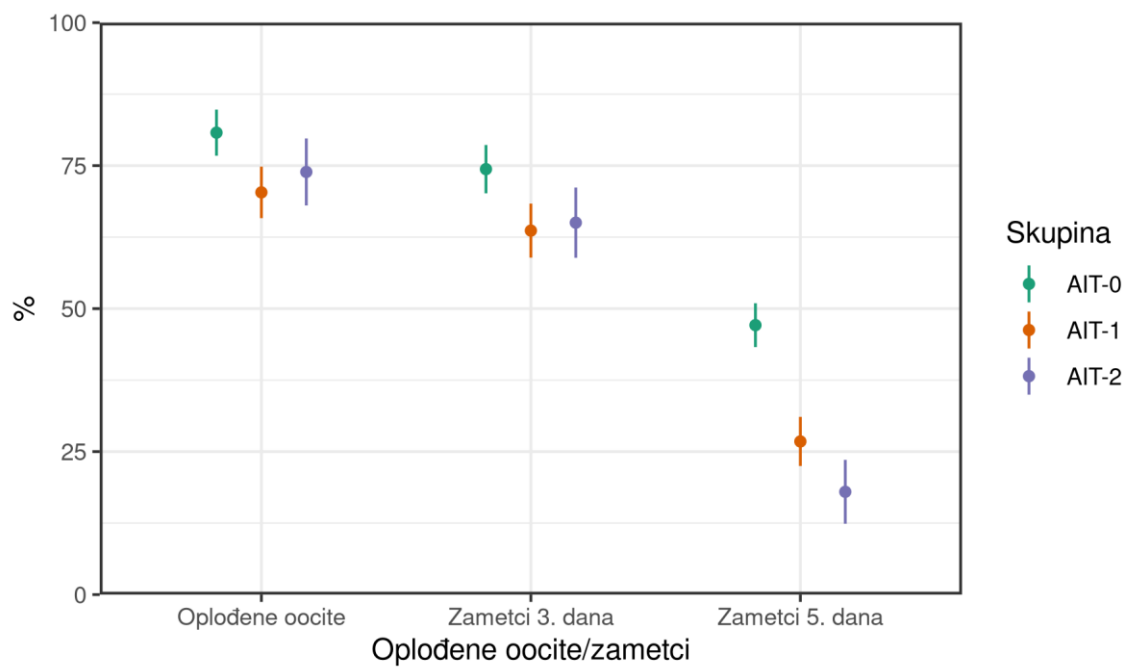
Slika 21. Prosječni udio zametaka u razvoju 3.dan uz interval pouzdanosti ($\alpha = 95\%$).

AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom



Slika 22. Prosječni udio razvijenih blastocisti uz interval pouzdanosti ($\alpha = 95\%$).

AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom



Slika 23. Prosječni udio oplođenih oocita i razvijenih zametaka prema podskupinama uz interval pouzdanosti ($\alpha = 95\%$).

AIT-0 kontrolna skupina, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom.

4.2. Genetička analiza čimbenika koagulacije u ispitanica s autoimunim tireoditisom

4.2.1. Analiza frekvencije genotipova i alela MTHFR C677T i A1298C u podskupinama ispitanica

Ukupno je analizirano 143 uzoraka krvi ispitanica s AIT: u podskupini AIT-1 (N = 91), a u podskupini AIT-2 (N= 54), Razlike u frekvencijama genotipova i alela MTHFR C677T i A1298C, kao i složenog heterozigota CT/AC, između podskupina AIT-1 i AIT-2 analizirane su χ^2 testom (Tablica 11, 12 i 13). Statistički značajna razlika utvrđena je u distribuciji genotipova MTHFR C677T polimorfizma između AIT1 i AIT2 podskupina ($p = 0,00065$; Tablica 11). U AIT-2 podskupini značajno su češće bili prisutne heterozigotne i homozigotne polimorfne varijante (44,4% i 22,2%) u odnosu na AIT1 podskupinu (27,5% i 7,7%) (Tablica 11). Analiza alelne distribucije također je pokazala značajne razlike ($p = 0,00006$) (Tablica 11). T alel bio je znatno češći u AIT2 podskupini (44,4%) u odnosu na AIT1 (21,4%). Učestalost genotipova A1298C nije bila statistički značajno različita između podskupina s AIT kao niti učestalost C alela (Tablica 12).

Tablica 11. Distribucija MTHFR C677T genotipova u AIT-1 i AIT-2 podskupini

	AIT-1 N (%)	AIT-2 N (%)	OR (95% CI)	p
Genotip				
CC	59 (64,8%)	18 (33,3%)	3,69 (1,81–7,51)	0,00032*
CT	25 (27,5%)	24 (44,4%)	0,47 (0,23–0,96)	0,038*
TT	7 (7,7%)	12 (22,2%)	0,29 (0,11–0,80)	0,016*
Ukupno (χ^2 test)	$\chi^2 = 14,68$			0,00065*
Alel				
C	143 (78,6%)	60 (55,6%)	2,93 (1,75-4,93)	<0,0001*
T	39 (21,4%)	48 (44,4%)	0,34 (0,20-0,57)	<0,0001*
Ukupno (χ^2 test)	$\chi^2 = 16,02$			0,00006*

MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza, N broj, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, * statistički značajna razlika, p razina statističke značajnosti <0.05

Tablica 12. Distribucija MTHFR A1298C genotipova u AIT-1 i AIT-2 podskupini

	AIT-1 N (%)	AIT-2 N (%)	OR (95% CI)	p
Genotip				
AA	53 (58,2%)	29 (53,7%)	1,20 (0,61-2,37)	0,594
AC	32 (35,2%)	21 (38,9%)	0,85 (0,43-1,71)	0,653
CC	6 (6,6%)	4 (7,4%)	0,88 (0,24-3,28)	0,852
Ukupno (χ^2 test)	$\chi^2 = 0,28$			0,867
Alel				
A	138 (78,6%)	79 (73,1%)	1,15 (0,67-1,98)	0,612
C	44 (21,4%)	29 (26,9%)	0,87 (0,50-1,50)	0,612
Ukupno (χ^2 test)	$\chi^2 = 0,14$			0,713

MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza, N broj, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, p razina statističke značajnosti <0.05

Dodatno smo ispitali razliku u učestalost složenog heterozigotnog genotipa MTHFR C677T CT/MTHFR A1298C AC između dvije ispitivane skupine. Rezultati su pokazali da je taj genotipski obrazac značajno češći u podskupini AIT-2 (22,2% vs. 8,8%, $p = 0,044$; Tablica 13).

Tablica 13. Distribucija složenog heterozigotnog genotipa MTHFR C677T CT / A1298C AC u AIT-1 i AIT-2 podskupini

	AIT-1 N (%)	AIT-2 N(%)	χ^2	p
C677T CT/ A1298C AC	8 (8,8%)	12 (22,2%)	4,07	0,044*

MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza, N broj, AIT-1 AIT pozitivne ispitanice s održanom ovarijskom rezervom, AIT-2 AIT pozitivne ispitanice sa smanjenom ovarijskom rezervom, * statistički značajna razlika, p razina statističke značajnosti <0.05

4.2.2. Analiza utjecaja genotipova MTHFR polimorfizama C677T i A1298C na ishode ovarijske stimulacije

Regresijskom analizom analizirana je povezanost različitih genotipova MTHFR (C677T i A1298C) na ishode postupka MPO u žena s autoimunim tireoiditisom, u svakoj podskupini (AIT-1 i AIT-2) zasebno. Analizirani su parametri uključujući udio MII oocita, udio oplođenih jajnih stanica, ukupni broj oocita te udio zametaka trećeg i petog dana (Tablice 14, 15, 16 i 17). Ovom analizom uspoređeni su genotipovi CC, CT i TT za polimorfizam C677T i AA, AC i CC za polimorfizam A1298C za svaki pojedini ishod MPO postupka. Radi dodatne interpretacije rezultata i preciznijeg uvida u moguće biološke učinke najčešćih genetskih varijacija, provedena je i analiza složenih kombinacija genotipova. Genotipovi oba polimorfizma kombinirani su na način da se usporede razlike između ispitanica sa:

1. Referentnim genotipovima oba polimorfizma, bez ijedne polimorfne varijante (homozigotni genotip divljeg tipa oba polimorfizma):
 - C677T CC genotip / A1298C AA genotip
2. Po jednom polimorfnom varijantom u jednom od ispitivanih polimorfizama (homozigotni genotip divljeg tipa jednog polimorfizma u kombinaciji s heterozigotnim genotipom drugog polimorfizma):
 - C677T CC genotip / A1298C AC genotip
 - C677T CT genotip / A1298C AA genotip
3. Ukupno dvije polimorfne varijante, bilo s dva u jednom ispitivanom polimorfizmu ili s jednim u oba ispitivana polimorfizma (homozigotni genotip divljeg tipa jednog polimorfizma u kombinaciji s varijantnim homozigotnim genotipom drugog polimorfizma ili heterozigotni genotipovi oba polimorfizma – složeni heterozigot):
 - C677T CC genotip / A1298C CC genotip
 - C677T CT genotip / A1298C AC genotip
 - C677T TT genotip / A1298C AA genotip

U podskupini ispitanica s održanom ovarijskom rezervom (AIT-1) za C677T polimorfizam MTHFR, razlike (za CT i TT genotipe) u ishodima medicinski pomognute oplodnje (udio MII oocita, udio oplodjenih jajnih stanica, ukupni broj oocita, udio zametaka petog dana po oplodnji) nisu bile statistički značajne (Tablice 14 i 15). Zabilježena je jedino značajna razlika u udjelu razvijenih zametaka trećeg dana po oplodnji između ispitanica s CT genotipom u odnosu na referentni CC genotip ($b = 14,82$; 95% CI: 1,09 do 28,55; $p = 0,035$; Tablica 15.). Za A1298C polimorfizam MTHFR u slučaju genotipa CC zabilježen je povećani udio MII oocita u odnosu na referentni AA genotip ($b = 19,01$; 95% CI: 3,81 do 34,21; $p = 0,015$; Tablica 14). Razlike među ostalim analiziranim ishodima (udio oplodjenih oocita, ukupni broj oocita, udio zametaka 3. i 5. dan) nisu bile značajne. Također, niti jedna od složenih kombinacija genotipova (C677T CC / A1298C AC & C677T CT / A1298C AA i C677T CC / A1298C CC & C677T CT / A1298C AC & C677T TT / A1298C AA) nije bila povezana sa značajnim razlikama promatranih MPO ishoda. (Tablice 14 i 15).

Tablica 14. Genotipovi MTHFR polimorfizama i kvantitativni ishodi ovarijske stimulacije i oplodnje oocita analizirani linearnim regresijskim modelom u podskupini AIT-1

MTHFR polimorfizam i genotipovi	Udio MII oocita		Udio oplodjenih oocita		Ukupni broj oocita	
	b (95%CI)	p	b (95%CI)	p	b (95%CI)	p
C677T						
CC	Ref.		Ref.		Ref.	
CT	-6.11 (-17.27 do 5.05)	0,28	10.59 (-2.25 do 23.42)	0,105	-1.54 (-3.8 do 0.73)	0,181
TT	-12.06 (-24.91 do 0.8)	0,066	4.03 (-10.48 do 18.55)	0,582	0.48 (-2.15 do 3.11)	0,717
A1298C						
AA	Ref.		Ref.		Ref.	
AC	2.35 (-8.63 do 13.34)	0,671	-4.3 (-17.13 do 8.53)	0,507	1.13 (-1.15 do 3.41)	0,328
CC	19.01 (3.81 do 34.21)	0,015*	-0.74 (-18.44 do 16.95)	0,934	2.17 (-0.99 do 5.32)	0,176
C677T/A1298C kombinacija genotipova						
CC/AA	Ref.		Ref.		Ref.	
CC/AC & CT/AA	-3.86 (-19.32 do 11.59)	0,621	-3.77 (-21.23 do 13.7)	0,669	0.63 (-2.47 do 3.72)	0,689
CC/CC & CT/AC & TT/AA	-1.29 (-16.29 do 13.71)	0,864	2.06 (-14.75 do 18.86)	0,808	2 (-1.01 do 5.02)	0,191

MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza, b (95% CI) koeficijent razlike srednjih vrijednosti, uz 95%-tni interval pouzdanosti, * statistički značajna razlika, p razina statističke značajnosti <0.05

Tablica 15. Genotipovi MTHFR polimorfizama i razvoj zametaka u kulturi analizirani linearnim regresijskim modelom u podskupini AIT-1

MTHFR polimorfizam i genotipovi	Udio zametaka 3. dan		Udio zametaka 5. dan	
	b (95%CI)	p	b (95%CI)	p
C677T				
CC	Ref.		Ref.	
CT	14.82 (1.09 do 28.55)	0,035*	6.71 (-8.08 do 21.49)	0,37
TT	11.56 (-3.97 do 27.08)	0,143	3.54 (-13.19 do 20.27)	0,675
A1298C				
AA	Ref.		Ref.	
AC	-6.89 (-20.73 do 6.96)	0,325	5.77 (-8.83 do 20.38)	0,434
CC	-6.64 (-25.74 do 12.47)	0,492	4.24 (-15.91 do 24.38)	0,677
C677T/A1298C				
CC/AA	Ref.		Ref.	
CC/AC & CT/AA	0.44 (-18.48 do 19.35)	0,963	-0.56 (-20.32 do 19.2)	0,955
CC/CC & CT/AC & TT/AA	6.58 (-11.62 do 24.78)	0,474	9.05 (-9.97 do 28.06)	0,347

MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza, b (95% CI) koeficijent razlike srednjih vrijednosti, uz 95%-tni interval pouzdanosti, * statistički značajna razlika, p razina statističke značajnosti <0.05

Niti jedan analizirani genotip MTHFR C677T ili A1298C polimorfizama, nije bio značajno povezan s ishodima MPO u podskupini ispitanica sa smanjenom ovarijskom rezervom (AIT-2) (Tablica 16 i 17). U slučajevima složenih kombinacija genotipova dviju MTHFR polimorfizama u ovoj podskupini ispitanica također nisu utvrđene statistički značajne povezanosti s promatranim ishodima MPO.

Tablica 16. Genotipovi MTHFR polimorfizama i kvantitativni ishodi ovarijske stimulacije i oplodnje oocita analizirani linearnim regresijskim modelom u podskupini AIT-2

MTHFR polimorfizam i genotipovi	Udio MII		Udio oplođenih stanica		Ukupni broj stanica	
	b (95%CI)	p	b (95%CI)	p	b (95%CI)	p
C677T						
CC	Ref.		Ref.		Ref.	
CT	4.48 (-7.43 do 16.39)	0,454	-5.69 (-20.23 do 8.85)	0,435	-0.61 (-4.24 do 3.02)	0,738
TT	6.39 (-19.15 do 31.94)	0,617	3.67 (-27.51 do 34.86)	0,814	-6.61 (-14.4 do 1.18)	0,095
A1298C						
AA	Ref.		Ref.		Ref.	
AC	4.76 (-7.17 do 16.69)	0,427	1.47 (-13.45 do 16.38)	0,844	-3.09 (-6.76 do 0.57)	0,096
CC	20.6 (-9.28 do 50.48)	0,172	4.23 (-33.11 do 41.57)	0,821	3.06 (-6.12 do 12.25)	0,506
C677T/A1298C						
CC/AA	Ref.		Ref.		Ref.	
CC/AC & CT/AA	1.29 (-12.84 do 15.42)	0,855	-2.76 (-20.73 do 15.21)	0,759	-3.27 (-7.7 do 1.16)	0,145
CC/CC & CT/AC & TT/AA	13.29 (-2.29 do 28.87)	0,093	-1.2 (-21.02 do 18.62)	0,904	-4.35 (-9.24 do 0.54)	0,08

MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza, b (95% CI) koeficijent razlike srednjih vrijednosti, uz 95%-tni interval pouzdanosti, p razina statističke značajnosti <0.05

Tablica 17. Genotipovi MTHFR polimorfizama i razvoj zametaka u kulturi analizirani linearnim regresijskim modelom u podskupini AIT-2

MTHFR polimorfizam i genotipovi	Udio zametka 3. dan		Udio zametka 5. dan	
	b (95%CI)	p	b (95%CI)	p
C677T				
CC	Ref.		Ref.	
CT	-0.56 (-18.01 do 16.89)	0,949	1.67 (-12.71 do 16.05)	0,817
TT	15.41 (-22.01 do 52.83)	0,412	-22.23 (-53.07 do 8.61)	0,154
A1298C				
AA	Ref.		Ref.	
AC	5.03 (-12.76 do 22.81)	0,573	-6.6 (-21.08 do 7.89)	0,365
CC	14.42 (-30.11 do 58.94)	0,518	26.84 (-9.44 do 63.12)	0,144
C677T/A1298C				
CC/AA	Ref.		Ref.	
CC/AC & CT/AA	5.11 (-16.25 do 26.47)	0,633	-3.23 (-21.27 do 14.81)	0,721
CC/CC & CT/AC & TT/AA	11.6 (-11.95 do 35.15)	0,327	-4.71 (-24.61 do 15.18)	0,636

MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza, b (95% CI) koeficijent razlike srednjih vrijednosti, uz 95%-tni interval pouzdanosti, p razina statističke značajnosti <0.05

Uz regresijske analize provedene za procjenu utjecaja genotipova MTHFR polimorfizama na ishode ovarijske stimulacije, u obje su podskupine ispitanica dodatno provedene i nezavisne usporedbe skupina referentnih genotipova (CC za C677T polimorfizam te AA za A1298C polimorfizam) sa kombinacijom heterozigotnih i homozigotnih genotipova (CT+TT za C677T polimorfizam te AC+CC za A1298C polimorfizam) uz izračun Cohenova d kao mjere veličine učinka (Tablice 18, 19, 20, 21).

Tablica 18. Ishodi ovarijske stimulacije, oplodnje i kulture zametaka za C677T polimorfizam analizirani nezavisnim t testom (Welch t test) u podskupini AIT-1

Ishod	Genotip	SV $\pm$ SD	t	p	Cohenov d
Udio MII oocita	CC	80,132 $\pm$ 19,972	1,759	0,082	0,368
	CT + TT	71,673 $\pm$ 25,612			
Udio oplodjenih oocita	CC	74,105 $\pm$ 27,323	-1,39	0,168	-0,3
	CT + TT	82,08 $\pm$ 25,75			
Udio zametaka 3. dan	CC	62,842 $\pm$ 29,505	-2,203	0,031*	-0,477
	CT + TT	76,36 $\pm$ 27,156			
Udio zametaka 5. dan	CC	26 $\pm$ 30,352	-0,829	0,41	-0,178
	CT + TT	31,4 $\pm$ 30,186			
Ukupni broj oocita	CC	6,868 $\pm$ 4,922	0,751	0,455	0,16
	CT + TT	6,094 $\pm$ 4,749			

SV srednja vrijednost, SD standardna devijacija, t Studentov t-test, * statistički značajna razlika, p razina statističke značajnosti <0.05

Tablica 19. Ishodi ovarijske stimulacije, oplodnje i kulture zametaka za A1298C polimorfizam analizirani nezavisnim t testom (Welch t test) u podskupini AIT-1

Ishod	Genotip	SV $\pm$ SD	t	p	Cohenov d
Udio MII oocita	AA	72,226 $\pm$ 26,057	-1,538	0,128	-0,321
	AC + CC	79,568 $\pm$ 19,223			
Udio oplodjenih oocita	AA	80,02 $\pm$ 27,101	0,574	0,567	0,124
	AC + CC	76,73 $\pm$ 26,103			
Udio zametaka 3. dan	AA	73,412 $\pm$ 28,856	1,106	0,272	0,239
	AC + CC	66,541 $\pm$ 28,697			
Udio zametaka 5. dan	AA	26,843 $\pm$ 29,051	-0,798	0,428	-0,174
	AC + CC	32,135 $\pm$ 31,871			
Ukupni broj oocita	AA	5,833 $\pm$ 4,813	-1,411	0,162	-0,301
	AC + CC	7,27 $\pm$ 4,741			

SV srednja vrijednost, SD standardna devijacija, t Studentov t-test, * statistički značajna razlika, p razina statističke značajnosti <0.05

Tablica 20. Ishodi ovarijske stimulacije, oplodnje i kulture zametaka za C677T polimorfizam analizirani nezavisnim t testom (Welch t test) u podskupini AIT-2

Ishod	Genotip	SV $\pm$ SD	t	p	Cohenov d
Udio MII oocita	CC	76,696 $\pm$ 24,529	-0,78	0,44	-0,222
	CT + TT	81,379 $\pm$ 16,904			
Udio oplodjenih oocita	CC	73,913 $\pm$ 26,178	0,674	0,504	0,189
	CT + TT	69,138 $\pm$ 24,339			
Udio zametaka 3. dan	CC	62,261 $\pm$ 32,386	-0,118	0,906	-0,033
	CT + TT	63,276 $\pm$ 28,477			
Udio zametaka 5. dan	CC	22,13 $\pm$ 27,999	0,123	0,903	0,035
	CT + TT	21,241 $\pm$ 22,892			
Ukupni broj oocita	CC	8,609 $\pm$ 7,674	0,658	0,515	0,188
	CT + TT	7,379 $\pm$ 5,192			

SV srednja vrijednost, SD standardna devijacija, t Studentov t-test, * statistički značajna razlika, p razina statističke značajnosti <0.05

Tablica 21. Ishodi ovarijske stimulacije, oplodnje i kulture zametaka za A1298C polimorfizam analizirani nezavisnim t testom (Welch t test) u podskupini AIT-2

Ishod	Genotip	SV $\pm$ SD	t	p	Cohenov d
Udio MII oocita	AA	76,774 $\pm$ 21,721	-1,116	0,27	-0,311
	AC + CC	83,048 $\pm$ 18,538			
Udio oplođenih oocita	AA	70,516 $\pm$ 21,038	-0,237	0,814	-0,069
	AC + CC	72,333 $\pm$ 30,526			
Udio zametaka 3. dan	AA	60,452 $\pm$ 29,658	-0,686	0,497	-0,195
	AC + CC	66,333 $\pm$ 30,8			
Udio zametaka 5. dan	AA	23 $\pm$ 27,942	0,503	0,617	0,138
	AC + CC	19,619 $\pm$ 20,451			
Ukupni broj oocita	AA	8,935 $\pm$ 7,071	1,503	0,139	0,411
	AC + CC	6,429 $\pm$ 4,956			

SV srednja vrijednost, SD standardna devijacija, t Studentov t-test, * statistički značajna razlika, p razina statističke značajnosti <0.05

Najizraženiji učinak zabilježen je kod udjela zametaka 3. dana u AIT-1 skupini gdje je i regresijskom analizom utvrđena značajna razlika između CT i referentnog CC genotipa C677T polimorfizma (Tablica 15, $p = 0,035$), a značajnost je potvrđena i nezavisnim t-testom prilikom usporedbe CC s kombiniranom skupinom CT+TT (Tablica 18; $p = 0,031$; Cohenov $d = -0,48$). Važno je napomenuti da, iako je regresijskom analizom u AIT-1 skupini utvrđeno da CC genotip MTHFR A1298C polimorfizma ima značajno različit udio MII oocita u odnosu na referentni AA genotip (Tablica 14, $p = 0,015$), u dodatnim nezavisnim usporedbama t-testom ovaj razlika nije dosegla statističku značajnost (Tablica 19; $p = 0,128$; Cohenov $d = -0,32$). Za ostale analizirane ishode p-vrijednosti nisu odstupale od rezultata dobivenih regresijskom analizom ($p > 0,05$).

5. DISKUSIJA

Autoimuni tireoiditis je primarno poremećaj koji zahvaća štitnjaču, no u pregledu dostupne literature, koja se odnosi na liječenje neplodnosti u žena s AIT još uvijek nedostaju jasni dokazi koji povezuju disfunkciju jajnika i disfunkciju štitnjače u neplodnih žena, a i rezultati studija su oprečni jer su i polazišne točke prethodnih istraživanja različite. Cilj disertacije bio je analizirati povezanost AIT-a i ishoda MPO, uzimajući u obzir kvantitativne i kvalitativne pokazatelje kao što su sazrijevanje oocita, oplodnju i preimplantacijski razvoj embrija u *in vitro* uvjetima. Rezultati istraživanja dokazuju značajno lošije ishode nakon stimulacije jajnika gonadotropinima, nepravilnosti u sazrijevanju oocita, smanjenu oplodnju i posljedično slabiji razvoj embrija u kulturi u žena s AIT-om, bez obzira na OR. Između subpopulacija žena oboljelih od AIT, nisu dokazane značajne razlike u ishodima liječenja bez obzira na smanjenu ili održanu OR, što upućuje na autoimuni poremećaj kao glavni uzrok reproduksijskih neuspjeha, a ne značajno smanjenu OR koja se standardno procjenjuje prije početka stimulacije jajnika gonadotropinima.

Višestruke kliničke studije, sustavni pregledi i metaanalize istraživale su učinak AIT-a na uspjehnost metoda MPO, no zaključci su ostaju i dalje proturječni. Ta raznolikost rezultata i zaključaka dostupnih studija može se pripisati različitostima u dizajnu studija, veličini uzorka, definiranju eutireoze (granične vrijednosti TSH), uzrocima neplodnosti, vrsti MPO postupaka te krajnjim ishodima koji su analizirani u pojedinoj studiji [2,6,27,46-60,62-65].

Ovarijska rezerva uz životnu dob je jedan od ključnih čimbenika uspjeha/neuspjeha MPO postupaka budući da izravno i dokazano određuje odgovor jajnika na KOH [33,34,142]. Iako je više studija izvijestilo o povezanosti AIT-a sa smanjenom OR [30-35,144,145], ključno pitanje koje ostaje otvoreno jest koliki je stvarni doprinos autoimunosti u neuspjesima asistiranе reprodukcije, neovisno o statusu OR. Naši rezultati nepovoljne ishode MPO postupaka u ispitanica s AIT povezuju primarno s autoimunim statusom ispitanica, a ne nužno samo s kvantitativnim pokazateljima OR. To je u skladu s kliničkim zapažanjima lošijeg tijeka liječenja i slabijeg odgovora jajnika na KOH u ispitanica s AIT, čak i u slučaju održane OR. Određivanje hormonskih markera rezerve jajnika, posebno serumske koncentracije AMH, temelj je svakodnevne kliničke prakse, te smo na osnovi njihovih vrijednosti definirali subpopulacije ispitanica s AIT koje su se bitno razlikovale prema OR prije ovarijske stimulacije, a istovremeno su imale isti autoimuni poremećaj.

Suprotno nekim prethodnim studijama koje su identificirale niže koncentracije AMH u AIT populaciji [34-38], rezultati prikazani u ovoj disertaciji nisu potvrdili značajne razlike u pokazateljima OR

i ovarijske funkcije (AMH i FSH) između podskupine ispitanica s održanom OR (AIT-1) i kontrolne skupine ispitanica (AIT-0). Dakle, zaključujemo da AIT nije univerzalno povezan sa smanjenjem OR, no postoje žene koje uz AIT imaju ujedno i značajno smanjenu OR, pa ostaje pitanje uslijed čega je OR u toj subpopulaciji smanjena. Metaanaliza Hasegawe i sur. [146], primjerice, koja je obuhvatila devet studija pokazala je značajno niže serumske koncentracije AMH vrijednosti u eutiroidnih žena s AIT, što se razlikuje kao koncept od našeg istraživanja jer smo ispitanice s AIT-om dodatno stratificirali prema statusu OR, što omogućuje logičniju interpretaciju rezultata. Razlike u rezultatima općenito, pa tako i rezultatima ove disertacije mogu se objasniti i različitim metodološkim pristupima, uključujući definiciju eutireoze, dijagnostičkim kriterijima za AIT, korištenim testovima te vremenskim točkama uzorkovanja hormona, što je česti problem i onemogućava usklađivanje rezultata različitih studija. Nemamo objašnjenje zašto određeni udio ispitanica s AIT-om u našem istraživanju ima smanjenu OR, ali pretpostavljamo da bi mehanizmi koji dovode do smanjenja OR mogli uključivati cjelokupno trajanje autoimune bolesti, prisutnost drugih autoantitijela ili moguće genetičke čimbenike – potencijalno polimorfizme MTHFR koji su također obuhvaćeni ovim istraživanjem.

Autoimuni tireoiditis bez obzira na veličinu OR, može negativno utjecati na kvalitetu oocita, oplodnju u *in vitro* uvjetima i rani razvoj embrija u kulturi, što smo dokazali ovim istraživanjem. Naši rezultati podudaraju se s nalazima Safariana i sur. koji su također dokazali značajno niži udio MII oocita u ispitanica s AIT nakon KOH-a. Dodatno, njihovo istraživanje otkrilo je obrnuto proporcionalnu povezanost između koncentracije Anti-TPO u folikularnoj tekućini i broja MII oocita [56], što ukazuje na patofiziološku ulogu autoantitijela u lokalnom folikularnom mikrokruženju. Autoantitijela mogu doprinijeti imunološkoj neravnoteži unutar folikula, narušavajući folikulogenezu, sazrijevanje oocita i endokrinološku komunikaciju unutar ovarija [2,6,69,70].

Iako su ispitanice s AIT u našem istraživanju (podskupine AIT-1 i AIT-2) imale značajno različiti ukupni broj aspiriranih oocita, što je bilo očekivano s obzirom na početne razlike u OR, nismo dokazali značajne razlike u udjelu MII oocita, udjelu oplodjenih oocita u *in vitro* uvjetima niti u udjelu razvijenih preimplantacijskih zametaka. Dakle zaključujemo da AIT „podjednako” negativno utječe na folikulogenezu, oogenezu i ranu embriogenezu, bez obzira na procjenu OR prije početka stimulacije jajnika. Istraživanjem smo dokazali u obje podskupine s AIT-om lošiji ishod u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanica, što snažno podupire hipotezu da negativni učinak AIT-a na reproduksijske ishode u asistiranoj reprodukciji nije samo rezultat smanjene OR, već i posljedica autoimunih mehanizama koji izravno utječu na funkciju jajnika.

Magri i sur. [48] potvrđuju slično nema tezu da i eutiroidne žene s AIT mogu imati narušenu funkciju jajnika, neovisno o rezervi. Autori pretpostavljaju da ATAt, poput Anti-TPO, mogu djelovati lokalno u jajnicima, ometajući funkciju granuloznih stanica i autokrino ili parakrino djelovanje hormona jajnika koji su nužni za oogenezu i sazrijevanje oocita. Monteleone i sur. su dokazali Anti-TPO protutijela izravno na površini jajnih stanica, čime kompromitiraju njihovu kvalitetu i razvoj tijekom stimulacije gonadotropinima [23,76], a isto tako i fertilizaciju. Dakle, jajnik i štitnjača dokazano dijele zajedničke tkivne antigene, koji mogu biti uzrok disfunkcije jajnika, folikula i oocita. Ostaje nejasno radi li se o dva istovremena autoimuna zbivanja štitnjače i jajnika, ili je jajnik sekundarno ciljani organ čija disfunkcija nastaje nakon autoimunog poremećaja štitnjače.

Imunološka disregulacija u žena s AIT tijekom KOH-a dodatno potkrepljuje hipotezu o negativnom utjecaju autoimunosti na ishode MPO postupaka. Miko i sur. su izvijestili o promjenama u imunološkom profilu, uključujući povišeni omjer NK i NKT stanica tijekom KOH-a u žena s AIT [75]. Pojačana prirodna citotoksičnost, negativno utječe na razvoj folikula i sazrijevanje oocita. Slične imunološke promjene u folikularnoj mikrokolini dokumentirali su i Huang i sur., koji su dokazali aktivaciju upalne kaskade potaknute kemokinima u žena s AIT [147]. Povećane koncentracije kemokina induciranih interferonom- γ (CXCL9, CXCL10, CXCL11) mogu narušiti lokalnu ravnotežu između upalnih i antiupalnih čimbenika, stvarajući suboptimalno okruženje za sazrijevanje oocita i početni razvoj embrija [147]. Naši rezultati su u skladu s prethodnim studijama – u obje AIT podskupine zabilježen je lošiji embrionalni razvoj, uključujući niži udio zametaka i blastocista, u usporedbi s kontrolnom skupinom [148,149,150]. Zanimljivo je naglasiti, trećeg dana nakon oplodnje oocita nismo dokazali značajnu razliku u razvoju embrija između AIT podskupina, što potvrđuje hipotezu o autoimunim mehanizmima koji djeluju neovisno o statusu OR. Slične rezultate iznijeli su Herman i sur., čije istraživanje pokazuje da prisutnost AIT negativno utječe na broj dobivenih oocita, oplodnju nakon ICSI postupka, ali isključivo kod bolesnica mlađih od 35 godina. Kod starijih bolesnica takav učinak nije uočen, što sugerira da AIT može djelovati kao rani čimbenik koji narušava funkcionalnu kvalitetu jajnika i ubrzava njihovo starenje, i prije nego što se to očituje smanjenjem OR [149]. Weghofer i sur. su [51] pokazali da pozitivni Anti-TPO status, čak i uz normalne vrijednosti TSH, može negativno utjecati na kvalitetu embrija. Žene s pozitivnim Anti-TPO su imale lošiju kvalitetu embrija, unatoč eutireozu ($TSH \leq 2,5$ mIU/L). U recentnoj studiji Lu i suradnika također je zabilježen lošiji embrionalni razvoj i kvaliteta zametaka u ispitanica s AIT koji je bio naročito izražen u ispitanica s vrijednostima $TSH \geq 2.5$ i višim serumskim vrijednostima ATAt [150]. Slično, retrospektivna kohortna studija Andrisanija i sur. [52] je pokazala smanjenu kvalitetu embrija u žena s barem jednim pozitivnim ATAt, što potvrđuje ulogu imunoloških faktora, neovis-

no o hormonskom statusu štitnjače. Narušeno sazrijevanje i oplodnja oocita u prisutnosti ATAt-a vjerojatno su posljedica kombinacije upalnih signala, lokalne citotoksičnosti (NK/NKT stanice), kemokinske aktivnosti te mogućeg izravnog djelovanja autoantitijela na ovarijsko tkivo. Ovo je u skladu s nedavnim studijama koje pokazuju da AIT negativno utječe na ishod MPO-a i u žena sa smanjenom OR [51], ali i u onih s očuvanom funkcijom jajnika [48]. Prema konceptu naše disertacije u svih ispitanica je potvrđena eutireoza prije uključivanja u MPO ciklus i fokus je bio početni imunološki status ispitanica i OR. Rezultati našeg istraživanja su komplementarni s prethodnima: prisutnost ATAt pretpostavlja nepovoljni imunološki milje tijekom sazrijevanja oocita i negativno utječu na kvalitetu preimplantacijskih embrija [48,52,148,149,150].

Zaključujemo na temelju naših rezultata i prethodno navedenih studija da imunološka komponenta AIT-a, uključujući prisutnost ATAt i poremećeni stanični imunitet, predstavlja čimbenik koji značajno negativno utječe na rane stadije embrionalnog razvoja. Ovo otvara mogućnosti ciljane imunomodulacije tijekom liječenja neplodnosti žena s AIT koje prolaze kroz postupke MPO. Prethodno prikazani rezultati studija usmjerenih na probleme liječenja neplodnosti MPO u žena koje imaju autoimuni poremećaj funkcije štitnjače, pa tako i naši snažno podupiru potrebu za preciznijom imunološkom evaluacijom žena s AIT koje planiraju MPO, neovisno o razinama TSH i AMH. Potrebna su prospektivna randomizirana istraživanja koja će se fokusirati na korist adjuvantne terapije (npr. imunomodulatori, antioksidansi, ciljane protuupalne strategije) kako bi se poboljšali ishodi liječenja neplodnosti.

Zbog složene prirode AIT-a, njegove heterogene kliničke prezentacije i očite disfunkcije jajnika u nekih žena s AIT-om postavlja se pitanje postoji li dodatni čimbenik u vidu genetičke predispozicije koja djeluje sinergistički s autoimunim poremećajem te predodređuje slabost funkcije jajnika u žena sa smanjenom OR. Jedan od potencijalnih aktualnih modulatora o kojima se publicira u novijoj literaturi je varijabilnost u genu za *MTHFR*, koji je ključni enzim u metabolizmu folata i metilaciji DNK, što su vrlo intenzivni procesi tijekom folikulogeneze i embriogeneze [120,127-130]. Prema prethodnim istraživanjima smatra se da disbalans u metilaciji DNK, posredovan polimorfizmima *MTHFR* gena, može biti jedan od mehanizama gubitka imunološke tolerancije i stvaranja autoantitijela usmjerenih prema tkivu štitnjače [94,95]. Također sve je više dokaza da ovi polimorfizmi, osim povezanosti s autoimunim bolestima, mogu utjecati i na reproduktivske ishode (oogeneza, embriogeneza) te biti uzrok idiopatske neplodnosti, implantacijskih neuspjeha te slabijeg odgovora na KOH tijekom liječenja MPO [124-132]. Novija istraživanja povezuju polimorfizme *MTHFR* gena, posebno C677T, sa sazrijevanjem oocita i rezultatom postupaka MPO [127-131,134-138,140]. Međutim, vrlo je malo studija koje su ispitivale moguću povezanost ovih polimorfizama sa OR [131].

U tom kontekstu, naše istraživanje polazi od pretpostavke da istodobna prisutnost AIT i nekog od polimorfizama *MTHFR* gena može imati sinergistički učinak, narušavajući dodatno procese folikulogeneze, smanjujući OR, te negativno utjecati na ishode MPO. Ova interakcija mogla bi predstavljati značajan patofiziološki mehanizam neplodnosti kod genetički definirane određene skupine žena. Rezultati našeg istraživanja ukazuju na povezanost između polimorfizama *MTHFR* gena, osobito C677T i ovarijske funkcije u žena s AIT. Utvrđene varijante polimorfizma C677T značajno češće su prisutne u skupini žena sa smanjenom OR te mogu imati ulogu u ranijem iscrpljivanju ovarijske funkcije, dok je normalni CC genotip učestaliji kod žena s očuvanom rezervom. Ovakva raspodjela upućuje na zaštitnu ulogu referentnog C alela u očuvanju ovarijske funkcije i moguću povezanost između prisutnosti T alela i smanjene OR. Jednu od mogućih poveznica između smanjene OR i definiranih genskih polimorfizama predstavlja upravo metabolizam i aktivnost enzima *MTHFR*, bitnog u biološkim procesima sinteze i umnožavanja DNK, te procesima metilacije koji su u slučajevima ispitivanih polimorfizama smanjeni ili izmijenjeni.

Istraživanjem dokazane značajne razlike u distribuciji genotipova, osobito povećana učestalost homozigotnog TT genotipa u skupini žena s AIT i smanjenom OR, sugeriraju da bi C677T polimorfizam mogao biti genetički čimbenik i prediktor rizika za razvoj smanjene OR u žena s AIT-om. Jedno od objašnjenja biološke osnove ovakve povezanosti temelji se na prethodno poznatom učinku C677T polimorfizma na smanjenje aktivnosti *MTHFR* enzima, što povećava koncentraciju homocisteina u plazmi [86,87]. Hiperhomocisteinemija ima višestruke negativne učinke, uključujući oštećenje vaskularnog endotela, smanjenu perfuziju ovarijske kore te narušenu folikulogenezu [151,152]. U kontekstu AIT, gdje ujedno postoji imunološka disregulacija i povećan oksidativni stres, dodatna prisutnost hiperhomocisteinemije može pogoršati funkciju jajnika.

Polimorfizam A1298C nismo povezali s ovarijskom rezervom u promatranoj populaciji žena s AIT. Suprotno rezultatima našeg istraživanja Rosen i sur. ukazuju na njegovu ulogu u modulaciji folikulogeneze i povezanost s višim bazalnim razinama FSH [119]. Iako je poznato da varijanta A1298C ima blaži učinak na enzimsku aktivnost *MTHFR*-a te rijetko samostalno dovodi do klinički značajne hiperhomocisteinemije [85,133,138,140], naši rezultati upućuju na to da ona ipak može imati klinički relevantnu ulogu u kombinaciji s drugim polimorfizmima, osobito s C677T varijantom.

S obzirom da prisutnost istovremenog prisustva dviju različitih polimorfničkih varijanti (jedne na lokusu 677, a druge na lokusu 1298) može imati funkcionalni učinak sličan homozigotnom stanju za jedan polimorfizam, odnosno dovesti do značajnijeg smanjenja aktivnosti *MTHFR* enzima

dodatno smo ispitali razliku u učestalost složenog heterozigotnog genotipa *MTHFR* C677T CT/*MTHFR* A1298C AC između dvije ispitivane skupine.

Analiza pojavnosti složenog heterozigota C677T CT / A1298C AC je dokazala značajno češću prisutnost ove kombinacije u žena s AIT i smanjenom OR. Međutim, navedene rezultate potrebno je tumačiti s oprezom. Obzirom na to da je distribucija C677T varijante bila značajno veća u žena sa smanjenom OR, a da se distribucija polimorfizma A1298C nije razlikovala među skupinama s održanom i smanjenom OR opravdano je zaključiti da uočena značajnost složenog heterozigota odražava prvenstveno učinak C677T polimorfizma.

U tom kontekstu, A1298C se ne pokazuje kao neovisan čimbenik povezan s promjenom OR, već se čini da ukupna povezanost složenog genotipa s smanjenom OR proizlazi iz dominantnog utjecaja C677T varijante. Možemo pretpostaviti da kombinirana prisutnost ovih polimorfizama, ne predstavlja novi neovisni rizik, već se nadovezuje na dobro dokumentiranu povezanost C677T mutacije s poremećenim metabolizmom folata i metilacijskih procesa tijekom ključnih faza razvoja oocita i embrija [134–136].

Dosadašnja istraživanja rijetko su bila usmjerena na ulogu složenog heterozigota u reproduktivskoj funkciji, iako je poznato da je njegova prisutnost povezana s kumulativnim smanjenjem aktivnosti *MTHFR* enzima i do 50 % u odnosu na normalnu aktivnost u slučaju divljeg tipa gena. [130,133,140]. Naši rezultati u skladu su s tim biološkim saznanjima, ali istovremeno naglašavaju da je upravo C677T polimorfizam glavni nositelj uočenih razlika u populaciji žena s AIT-om.

Budući da smo dokazali povezanost određenih polimorfizama *MTHFR* gena i funkcije jajnika, daljnji interes istraživanja je bio usmjeren na povezanost polimorfizama *MTHFR* gena i ishoda liječenja MPO-om. Prema pregledu literature rezultati su za sada neujednačeni i oprečni [104-120, 124-131,153-154].

Razlike u udjelu MII oocita, udjelu oplođenih oocita, ukupnom broju oocita te u udjelima zametaka trećeg i petog dana između podskupina ispitanica s AIT i različitom OR smo analizirali u odnosu na ciljane polimorfizme. Osim regresijskih analiza koje su procjenjivale povezanost ispitivanih polimorfizama i ishoda ovarijske stimulacije, učinjene su i nezavisne usporedbe referentnih genotipova oba polimorfizma s kombinacijom heterozigotnih i homozigotnih genotipova, pri čemu je za procjenu veličine snage učinka korišten Cohenov d. Rezultati su korišteni kao dopunska provjera robusnosti regresijskog modela.

Povezanost polimorfizama *MTHFR* gena s ishodima MPO u ispitanica s AIT nije jednoznačna i ovisi o statusu OR. Rezultati našeg istraživanja djelom su kontradiktorni s određenim studijama koje su povezale CT genotip C677T polimorfizma s negativnim ishodima liječenja postupcima MPO, poput smanjenog broja oocita [134,136], slabijeg sazrijevanja oocita [140], manjeg udjela oplodjenih oocita [153], lošije kvalitete zametaka [132]. Glavna razlika istraživanja prikazanog u disertaciji u odnosu na navedene publikacije je izdvojeno promatranje ishoda liječenja u ispitanica s AIT s održanom ili smanjenom OR. Suprotno prethodno navedenim istraživanjima uočili smo bolji preimplantacijski razvoj zametaka u nositeljica CT genotipa C677T polimorfizma u odnosu na referentni CC genotip u skupini ispitanica s očuvanom OR (AIT-1). Navedeno sugerira povoljan učinak T alela na rani embrionalni razvoj u slučaju održane OR. Rezultat je potvrđen i dodatnom nezavisnom analizom t-testom, koja je u slučaju C677T polimorfizma kombinirala heterozigotni CT i homozigotni genotip TT te ih zajednički usporedila sa referentnim CC genotipom. Ovi se rezultati podudaraju s istraživanjem Laanpere i suradnika koji su T alel povezali s boljom kvalitetom zametaka u kulturi [155]. U nositeljica TT genotipa uočili smo tendenciju smanjenog udjela MII oocita, što bi moglo ukazivati na kompromitiran proces sazrijevanja oocita unatoč boljem embrionalnom razvoju. Ovaj je rezultat u skladu s prethodnim istraživanjem Zeng i suradnika [127] kojim je utvrđeno da TT genotip dovodi do slabijeg odgovora na KOH, lošije kvalitete oocita i nižeg udjela implantacije. Osim toga, Pavlik i suradnici također su povezali TT genotip s brojem oocita nižim od očekivanog na temelju AMH vrijednosti [136]. Ove studije podupiru teoriju da C677T polimorfizam negativno utječe na folikulogenezu i kvalitetu gameta, osobito u kontekstu homozigotnog TT genotipa [136,140,150]. Unatoč tome, određena istraživanja nisu potvrdila navedene učinke [119,128,153,154] ili su čak zabilježila suprotan učinak, gdje je T alel bio povezan s boljim ishodima [155]. S obzirom na pozitivan učinak CT genotipa na rani embrionalni razvoj utvrđen u našem istraživanju, može se pretpostaviti protektivna uloga T alela. Međutim, dobiveni heterogeni rezultati istodobno upućuju na to da su učinci genotipova C677T polimorfizma vjerojatno specifični za podskupinu AIT bolesnica koje imaju očuvanu OR što je područje koje dosad nije dovoljno istraženo.

Ovakvi rezultati otvaraju pitanje u kojoj mjeri specifični imunološki i metabolički uvjeti u žena s AIT-om mogu modulirati učinke polimorfizama *MTHFR* gena na reproduktivnu funkciju.

Za razliku od AIT-1 skupine, u ispitanica sa smanjenom OR (AIT-2) nijedan od analiziranih genotipova ispitivanih polimorfizama nije bio povezan s MPO ishodima što sugerira da u uvjetima značajno kompromitirane ovarijske funkcije prije početka liječenja neplodnosti MPO postupcima

potencijalni učinci genskih varijanti na ishode liječenja ostaju nejasni, u odnosu na dominantan utjecaj primarno smanjene ovarijske rezerve a time i očekivanog slabijeg ishoda liječenja MPO.

Prethodna istraživanja o potencijalnoj povezanosti A1298C polimorfizma i plodnosti su proturječna i nedosljedna. Dok su neki autori izvijestili o negativnim učincima A1298C na plodnost [119,132, 138,156,157], drugi nisu pronašli značajne povezanosti [154]. Ova nedosljednost objavljenih rezultata može biti posljedica metodoloških razlika, veličine uzorka, ispitivane populacije, komorbiditeta u ispitanica poput autoimunog statusa, što se pokazalo značajnim čimbenikom u našoj studiji.

U podskupini ispitanica s AIT i održanom OR regresijskom analizom je dokazan značajno veći udio MII oocita kod ispitanica s CC genotipom u usporedbi s referentnim AA genotipom. Međutim, naknadnom analizom kojom su heterozigotni AC i homozigotni CC genotipi promatrani zajedno u odnosu na AA referentni genotip, broj oocita se nije značajno razlikovao. Ova neusklađenost rezultata vjerojatno je posljedica uključivanja heterozigota u testiranje, a time i gubitka značajnosti koja je regresijskom analizom utvrđena testiranjem isključivo homozigotnih AA i CC genotipova. Navedeno također ukazuje da CC genotip A1298C polimorfizma vjerojatno nema kliničku relevantnost. Stoga se može zaključiti da A1298C polimorfizam u kontekstu naše studije vjerojatno nema neovisni utjecaj na udio MII oocita niti na ishode MPO postupaka, čime se potvrđuje dominantna uloga C677T varijante u analiziranoj populaciji.

Prethodno prikazani rezultati proteklih studija ističu negativni učinak kombiniranih polimorfizama C677T i A1298C na embriološke i kliničke ishode MPO postupaka [130,133,140]. Suprotno tim istraživanjima rezultati našeg istraživanja te dodatne analize složenih kombinacija genotipova (C677T CC / A1298C AC & C677T CT / A1298C AA i C677T CC / A1298C CC & C677T CT / A1298C AC & C677T TT / A1298C AA) nisu pokazale konzistentnu povezanost s ishodima MPO niti u jednoj od podskupina ispitanica s AIT. Iako se teorijski može očekivati kumulativno smanjenje enzimske aktivnosti MTHFR s većim brojem polimorfničkih varijanti, a s time i lošiji ishod MPO, takav učinak nismo potvrdili na razini ishoda stimulacije, oplodnje ili ranog embrionalnog razvoja. Moguće je da se negativni učinci složenih genotipskih obrazaca izraženi očituju u kasnijim fazama reproduktivnog procesa, poput implantacije ili održavanja rane trudnoće, što ovim istraživanjem nije bilo obuhvaćeno.

Završno rezultati prikazani u disertaciji potvrđuju povezanost polimorfizama gena *MTHFR* s OR, budući da su značajno češći u bolesnicima s AIT i disfunkcijom jajnika. Učinci polimorfizama *MTHFR* gena nisu jednoznačni, već su vjerojatno modulirani autoimunim poremećajem koji zahvaća

štitnjaču, jajnik i posebno zalihi primordijalnih folikula jajnika što se manifestira smanjenjem OR u žena s AIT. U kliničkom radu genotipizacija bolesnica s AIT može doprinositi probiru bolesnica s rizikom za raniji gubitak reproduktivske funkcije jajnika.

Naši rezultati sugeriraju da genetička varijabilnost u *MTHFR* genu, osobito prisutnost T alela i TT genotipa C677T polimorfizma, može imati ulogu u patogenezi smanjene OR kod žena s AIT. Iz toga proizlazi da poznavanje genetičkog profila *MTHFR* gena može doprinijeti individualizaciji pristupa reproduktivskom liječenju žena s AIT-om, posebno u procjeni rizika i planiranju potencijalnih terapijskih intervencija. Obzirom na genetičku heterogenost populacije, u kontekstu liječenja MPO potrebna su istraživanja na većim kohortama i funkcionalne studije nužne za potvrdu i proširenje ovih rezultata, kao i studije usmjerene na razjašnjavanje mehanizama kojima *MTHFR* polimorfizmi, uz imunološke i endokrinološke čimbenike, utječu na oogenezu i embriogenezu u *in vitro* uvjetima, a time i na uspjeh MPO postupaka. Rezultati prikazani u disertaciji naglašavaju važnost individualizirane procjene bolesnica s AIT koje se liječe MPO postupcima, uključujući imunološku i genetičku dijagnostiku, otvaraju mogućnost za razvoj ciljane adjuvantne terapije, osobito imunomodulacijske, s ciljem poboljšanja reproduktivskih ishoda u ovoj visoko rizičnoj skupini. Time se pridonosi sveobuhvatnijem razumijevanju etiopatogeneze neplodnosti u ovoj specifičnoj populaciji. Premda veličina uzorka ograničava donošenje konačnih kliničkih smjernica, rezultati otvaraju prostor za primjenu *MTHFR* genotipizacije kao dijela dijagnostičke i prognostičke obrade kod neplodnosti povezanih s AIT-om.

Potencijalne kliničke implikacije vrijedne su zbog personaliziranog pristupa reproduktivskom liječenju, kao i razmatranja preventivnih mjera, poput suplementacije folatima u aktivnom obliku (L-metilfolat), s ciljem poboljšanja metilacijske ravnoteže i smanjenja koncentracije homocisteina. Naša studija ima određena ograničenja kao što su relativno mali uzorak ispitanica i nedostatak praćenja vrijednosti homocisteina, što bi vjerojatno potvrdilo funkcionalnu implikaciju genotipizacije. Ovo je jedno od rijetkih istraživanja koje se bavi ovom specifičnom interakcijom između genetičkih i autoimunih faktora u kontekstu liječenja neplodnosti. Kako bi se ova opažanja potvrdila i proširila, nužna su opsežnija istraživanja na većim populacijskim uzorcima, kao i funkcionalne studije usmjerene na razjašnjavanje međudjelovanja između *MTHFR* polimorfizma, metabolizma folata i autoimunih procesa. Integracija genetičkih i imunoloških parametara mogla bi predstavljati ključni korak prema personaliziranoj medicini u MPO postupcima, osobito kod žena s autoimunim bolestima štitnjače.

6. ZAKLJUČCI:

Osnovna hipoteza istraživanja je potvrđena: rezultati KOH procijenjeni na temelju broja aspiriranih oocita, udjela MII oocita, nezrelih i atretičnih oocita, oplođenih oocita, te zametaka u razvoju 3. dan i 5. po fertilizaciji, slabiji su u ispitanica s AIT. Iz toga proizlazi da AIT predstavlja samostalni čimbenik nepovoljnog ishoda KOH-a budući da su uočeni lošiji ishodi u ispitanica s AIT u odnosu na zdrave ispitanice. Slabiji ishod je zamijećen u obje podskupine ispitanica s AIT iz čega zaključujemo da je učinak KOH-a neovisan je o OR.

Učestalost TT homozigotnih ili heterozigotnih genotipova C677T polimorfizma *MTHFR* gena bila je značajno češća u skupini ispitanica s AIT i smanjenom OR (AIT-2) u odnosu na „divlji” genotip koji je češće prisutan u ispitanica s održanom OR (AIT-1). Alel C bio je češći u podskupini s održanom OR (AIT-1), a alel T u podskupini sa smanjenom OR (AIT-2). Učestalosti genotipova i alela A1298C polimorfizma nisu se značajno razlikovale između skupina ispitanica s AIT (AIT-1 vs. AIT-2).

U nositeljica polimorfizama gena za *MTHFR* ne postoji jasna značajna povezanost određenog polimorfizma i rezultata KOH između podskupina ispitanica s AIT (AIT-1 i AIT-2).

Zaključci koji proizlaze iz specifičnih ciljeva su sljedeći:

- Srednja koncentracija hormona FSH u ispitanica s AIT i smanjenom OR bila je značajno veća, a srednja koncentracija AMH bila je značajno manja (AIT-2 vs. AIT-0 i AIT-1). Srednja koncentracija TSH bila je značajno veća u ispitanica s AIT i održanom OR (AIT-1 vs. AIT-0) i slična ispitanicama s AIT i smanjenom OR (AIT-1 vs. AIT-2). Koncentracija antitijela štitnjače nije se razlikovala između podskupina (AIT-1 vs. AIT-2).

- Srednja vrijednost ukupnog broja aspiriranih oocita bila je značajno manja u podskupinama ispitanica s AIT u odnosu na kontrolni skupinu zdravih ispitanica (AIT-1, AIT-2 vs. AIT-0), dok je najmanja srednja vrijednost uočena u skupini ispitanica sa smanjenom OR (AIT-2 vs. AIT-0 i AIT-1). Ovakvi su rezultati očekivani obzirom na uključne kriterije za podskupinu AIT-2.

- Udio zrelih oocita (MII faza) u odnosu na ukupni broj aspiriranih oocita bio je značajno manji u obje podskupine ispitanica s AIT u odnosu na zdrave ispitanice (AIT-1, AIT-2 vs. AIT-0). Udio zrelih oocita nije se značajno razlikovao u podskupinama s AIT (AIT-1 vs. AIT-2).

-Udio nezrelih oocita (MI faza) bio je značajno veći u ispitanica s AIT i održanom OR u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanica (AIT-1 vs. AIT-0). Udio atretičnih oocita bio je značajno veći u ispitanica s AIT i smanjenom OR u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanica (AIT-2 vs. AIT-0). Udio germinativnih vezikula nije se razlikovao među skupinama i podskupinama ispitanica.

-Postotak oplodnje bio je značajno manji u podskupini ispitanica s AIT i održanom OR u odnosu na zdrave ispitanice (AIT-1 vs. AIT-0). Srednja vrijednost broja oplođenih jajnih stanica bila je značajno manja u skupinama ispitanica s AIT u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanica (AIT-1, AIT-2 vs. AIT-0). Najmanja srednja vrijednost oplođenih jajnih stanica utvrđena je u podskupni ispitanica s AIT i smanjenom OR.

-Udio zametaka u razvoju 3. dan po fertilizaciji bio je značajno manji u podskupinama ispitanica s AIT u odnosu na zdrave ispitanice (AIT-1, AIT-2 vs. AIT-0), a nije se značajno razlikovao između podskupina ispitanica s AIT (AIT-1 vs. AIT-2). Udio zametaka u razvoju 5. dan po fertilizaciji bio je značajno manji u podskupinama ispitanica s AIT u odnosu na zdrave ispitanice (AIT-1, AIT-2 vs. AIT-0) i značajno manji u podskupini ispitanica s AIT i smanjenom OR. (AIT-2 vs. AIT-0, AIT-1).

7. LITERATURA

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, i sur. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril*. 2017;108:393–406.
2. Bucci I, Giuliani C, Di Dalmazi G, Formoso G, Napolitano G. Thyroid autoimmunity in female infertility and assisted reproductive technology outcome. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:768363.
3. Poppe K, Velkeniers B, Glinoe D. The role of thyroid autoimmunity in fertility and pregnancy. *Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4:394–405.
4. Poppe K. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Thyroid and female infertility: more questions than answers?! *Eur J Endocrinol*. 2021;184:123–35.
5. Mintziori G, Anagnostis P, Toulis KA, Goulis DG. Thyroid diseases and female reproduction. *Minerva Med*. 2012;103:47–62.
6. Tańska K, Gietka-Czernel M, Glinicki P, Kozakowski J. Thyroid autoimmunity and its negative impact on female fertility and maternal pregnancy outcomes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;13:1049665.
7. Mintziori G, Anagnostis P, Toulis KA, Goulis DG. Thyroid diseases and female reproduction. *Minerva Med*. 2012;103:47–62.
8. Poppe K, Bisschop P, Fugazzola L, Minziori G, Unuane D, Weghofer A. 2021 European Thyroid Association Guideline and thyroid disorders prior to and during assisted reproduction. *Eur Thyroid J*. 2021;9:281–95.
9. Vissenberg R, Manders VD, Mastenbroek S, i sur. Pathophysiological aspects of thyroid hormone disorders/thyroid peroxidase autoantibodies and reproduction. *Hum Reprod Update*. 2015;21:378–87.
10. Krassas GE, Poppe K, Glinoe D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocr Rev*. 2010;31:702–55.
11. Oki N, Matsuo H, Nakago S, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Maruo T. Effects of 3,5,3'-triiodothyronine on the invasive potential and the expression of integrins and matrix metalloprotei-

- nases in cultured early placental extravillous trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5213–21.
12. Chen LM, Zhang Q, Si GX i sur. Associations between thyroid autoantibody status and abnormal pregnancy outcomes in euthyroid women. *Endocrine.* 2015;48:924–8.
13. Stagnaro-Green A, Abalovich M, Alexander E i sur. Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum. *Thyroid.* 2011;21:1081–125.
14. Alexander EK, Pearce EN, Brent GA i sur. 2017 Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and the postpartum. *Thyroid.* 2017;27:315–89.
15. Dhillon-Smith RK, Middleton LJ, Sunner KK i sur. Levothyroxine in women with thyroid peroxidase antibodies before conception. *N Engl J Med.* 2019;380:1316–25.
16. Romitti M, Fabris VC, Ziegelmann PK, Maia AL, Spritzer PM. Association between PCOS and autoimmune thyroid disease: a systematic review and meta-analysis. *Endocr Connect.* 2018;7:1158–67.
17. Arora S, Sinha K, Kolte S, Mandal A. Endocrinal and autoimmune linkage: evidences from a controlled study of subjects with polycystic ovarian syndrome. *J Hum Reprod Sci.* 2016;9:18–22.
18. 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;150:363–9.
19. Petta CA, Arruda MS, Zantut-Wittmann DE, Benetti-Pinto CL. Thyroid autoimmunity and thyroid dysfunction in women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2007;22:2693–7.
20. Shigesaki N, Kvaskoff M, Kirtley S i sur. The association between endometriosis and autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2019;25:486–503.
21. Peyneau M, Kaviani N, Chouzenoux S i sur. Role of thyroid dysimmunity and thyroid hormones in endometriosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116:11894–9.
22. Silva JF, Ocarino NM, Serakides R. Thyroid hormones and female reproduction. *Biol Reprod.* 2018;99:907–21.

23. Monteleone P, Faviana P, Artini PG. Thyroid peroxidase identified in human granulosa cells: another piece to the thyroid-ovary puzzle? *Gynecol Endocrinol.* 2017;33:574–6.
24. Twig G, Shina A, Amital H, Shoenfeld Y. Pathogenesis of infertility and recurrent pregnancy loss in thyroid autoimmunity. *J Autoimmun.* 2012;38:275–81.
25. Rahnema R, Mahmoudi AR, Kazemnejad S i sur. Thyroid peroxidase in human endometrium and placenta: a potential target for anti-TPO antibodies. *Clin Exp Med.* 2021;21:79–88.
26. Colicchia M, Campagnolo L, Baldini E, Ulisse S, Valensise H, Moretti C. Molecular basis of thyrotropin and thyroid hormone action during implantation and early development. *Hum Reprod Update.* 2014;20:884–904.
27. Unuane D, Velkeniers B, Anckaert E i sur. Thyroglobulin autoantibodies: is there any added value in the detection of thyroid autoimmunity in women consulting for fertility treatment? *Thyroid.* 2013;23:1022–8.
28. Chen LM, Zhang Q, Si GX i sur. Associations between thyroid autoantibody status and abnormal pregnancy outcomes in euthyroid women. *Endocrine.* 2015;48:924–8.
29. Hou Y, Liu A, Li J i sur. Different thyroidal responses to human chorionic gonadotropin under different thyroid peroxidase antibody and/or thyroglobulin antibody positivity conditions during the first half of pregnancy. *Thyroid.* 2019;29:577–85.
30. Saglam F, Onal ED, Ersoy R i sur. Anti-Mullerian hormone as a marker of premature ovarian aging in autoimmune thyroid disease. *Gynecol Endocrinol.* 2015;31:165–8.
31. Ozturk Unsal I, Hepsen S, Akhanli P i sur. Evaluation of serum anti-Mullerian hormone levels in women with Hashimoto thyroiditis in the reproductive age. *Turk J Med Sci.* 2021;51:716–21.
32. Ozalp Akin E, Aycan Z. Evaluation of the ovarian reserve in adolescents with Hashimoto's thyroiditis using serum anti-Mullerian hormone levels. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2018;10:331–5.
33. Pirgon O, Sivrice C, Demirtas H, Dundar B. Assessment of ovarian reserve in euthyroid adolescents with Hashimoto thyroiditis. *Gynecol Endocrinol.* 2016;32:306–10.
34. Korevaar TIM, Minguez-Alarcón L, Messerlian C, i sur. Association of thyroid function and autoimmunity with ovarian reserve in women seeking infertility care. *Thyroid.* 2018;28:1349–58 .

35. Li Z, Xu S, Luo W, i sur. Association between thyroid autoimmunity and the decline of ovarian reserve in euthyroid women. *Reprod Biomed Online*. 2022;45:615–22.
36. Chen CW, Huang YL, Tzeng CR, Huang RL, Chen CH. Idiopathic low ovarian reserve is associated with more frequent positive thyroid peroxidase antibodies. *Thyroid*. 2017;27:1194–200.
37. Hsieh YT, Ho JYP. Thyroid autoimmunity is associated with higher risk of premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod*. 2021;36:1621–9.
38. Li F, Lu H, Huang Y, i sur. A systematic review and meta-analysis of the association between Hashimoto's thyroiditis and ovarian reserve. *Int Immunopharmacol*. 2022;108:108670.
39. Szeliga A, Calik-Ksepka A, Maciejewska-Jeske M, i sur. Autoimmune diseases in patients with premature ovarian insufficiency. *Int J Mol Sci*. 2021;22:2594.
40. Kirshenbaum M, Orvieto R. Premature ovarian insufficiency (POI) and autoimmunity. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36:2207–15.
41. Weghofer A, Barad DH, Darmon S, Kushnir VA, Gleicher N. What affects functional ovarian reserve: thyroid function or thyroid autoimmunity? *Reprod Biol Endocrinol*. 2016;14:26.
42. Morales-Martinez FA, Sordia-Hernandez LH, Merino Riuz M, i sur. Association between thyroid autoimmunity and ovarian reserve in women with hypothyroidism. *Thyroid Res*. 2021;14:6.
43. Polyzos NP, Sakkas E, Vaiarelli A, Poppe K, Camus M, Tournaye H. Thyroid autoimmunity, hypothyroidism and ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2015;30:1690–6.
44. Osuka S, Iwase A, Goto M, i sur. Thyroid autoantibodies do not impair the ovarian reserve in euthyroid infertile women. *Horm Metab Res*. 2018;50:537–42.
45. Bahri S, Tehrani FR, Amouzgar A, i sur. Overtime trend of thyroid hormones and thyroid autoimmunity and ovarian reserve. *BMC Endocr Disord*. 2019;19:47.
46. Fumarola A, Grani G, Romanzi D, i sur. Thyroid function in infertile patients undergoing assisted reproduction. *Am J Reprod Immunol*. 2013;70:336–41.
47. Zhong YP, Ying Y, Wu HT, i sur. Relationship between antithyroid antibody and pregnancy outcome after IVF-ET. *Int J Med Sci*. 2012;9:121–5.

48. Magri F, Schena L, Capelli V i sur. Anti Mullerian hormone as a predictor of ovarian reserve in ART protocols: the hidden role of thyroid autoimmunity. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:106.
49. Magri F, Capelli V, Gaiti M i sur. Impaired outcome of controlled ovarian hyperstimulation in women with thyroid autoimmune disease. *Thyroid*. 2013;23:1312–8.
50. 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;22:775–90.
51. 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;13:43.
52. Andrisani A, Sabbadin C, Marin L i sur. The influence of thyroid autoimmunity on embryo quality in women undergoing assisted reproductive technology. *Gynecol Endocrinol*. 2018;34:752–5.
53. Negro R, Mangieri T, Coppola L i sur. Levothyroxine treatment in thyroid peroxidase antibody-positive women undergoing assisted reproduction technologies: a prospective study. *Hum Reprod*. 2005;20:1529–33.
54. Inagaki Y, Takeshima K, Nishi M i sur. The influence of thyroid autoimmunity on pregnancy outcome in infertile women: a prospective study. *Endocr J*. 2020;67:859–68.
55. Poppe K, Autin C, Veltri F i sur. Thyroid autoimmunity and intracytoplasmic sperm injection outcome: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103:1755–66.
56. Safarian GKH, Niauri DA, Kogan IY, i sur. Impact of Antithyroperoxidase Antibodies (Anti-TPO) on Ovarian Reserve and Early Embryo Development in Assisted Reproductive Technology Cycles. *J Mol Sci* 2023;24:4705.
57. Akdulum MFC, Erdem M, Barut G, i sur. The relationship between thyroid autoimmunity and poor response to ovarian stimulation in IVF women with infertility. *Endokrynol Pol*. 2022;73:878–60.
58. Poppe K, Autin C, Veltri F, i sur. Thyroid disorders and in vitro outcomes of assisted reproductive technology: an unfortunate combination? *Thyroid*. 2020;30:1177–85.

59. Unuane D, Velkeniers B. Impact of thyroid disease on fertility and assisted conception. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2020;34:101378.
60. He Q, Zhang Y, Qiu W, i sur. Does thyroid autoimmunity affect the reproductive outcome in women with thyroid autoimmunity undergoing assisted reproductive technology? *Am J Reprod Immunol* 2020;84:e13321.
61. Seungdamrong A, Steiner AZ, Gracia CR, i sur. Preconceptional anti-thyroid peroxidase antibodies and decreased live birth rates in infertile women. *Fertil Steril.* 2017;108:843–50.
62. Huang N, Chen L, Lian Y, i sur. Impact of thyroid autoimmunity on IVF/ICSI outcomes and fetal weight. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:698579.
63. Unuane D, Velkeniers B, Deridder S, i sur. Impact of thyroid autoimmunity on cumulative delivery rates in IVF/ICSI patients. *Fertil Steril.* 2016;106:144–50.
64. Grigoriadis S, Maziotis E, Simopoulou M, i sur. The impact of thyroid autoantibodies positivity on in vitro fertilization outcome: A comprehensive review. *Int Arch Clin Physiol* 2019;1:002.
65. Venables A, Wong W, Way M, i sur. Thyroid autoimmunity and IVF/ICSI outcomes in euthyroid women: A systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 2020;18:120.
66. Toulis KA, Goulis DG, Venetis CA, i sur. Risk of Spontaneous Miscarriage in Euthyroid Women With Thyroid Autoimmunity Undergoing IVF: A Meta-Analysis. *Eur J Endocrinol* 2010;162:643–52.
67. Chai J, Yeung WYT, Lee CYV, Li HWR, Ho PC, Ng HYE. Live birth rates following in vitro fertilization in women with thyroid autoimmunity and/or subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014;80(1):122–7.
68. Zhao T, Chen BM, Zhao XM, i sur. Meta-analysis of ART outcomes in women with different preconception TSH levels. *Reprod Biol Endocrinol* 2018;16:111.
69. Zhu Q, Xu QH, Xie T, i sur. Recent Insights Into the Impact of Immune Dysfunction on Reproduction in Autoimmune Thyroiditis. *Clin Immunol* 2021;224:108663.
70. Dosiou C. Thyroid and Fertility: Recent Advances. *Thyroid* 2020;30:479–86.

71. Bogusławska J, Godlewska M, Gajda E, i sur. Cellular and molecular basis of thyroid autoimmunity. *Eur Thyroid J* 2022;11:e210024.
72. Deroux A, Dumestre-Perard C, Dunand-Faure C, i sur. Female Infertility and Serum Auto-Antibodies: A Systematic Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017;53:78–86.
73. Cellini M, Santaguida MG, Stramazzo I, i sur. Recurrent Pregnancy Loss in Women With Hashimoto's Thyroiditis With Concurrent Non-Endocrine Autoimmune Disorders. *Thyroid* 2020;30:457–62.
74. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:601–10.
75. Miko E, Meggyes M, Doba K, i sur. Characteristics of Peripheral Blood NK and NKT-Like Cells in Euthyroid and Subclinical Hypothyroid Women With Thyroid Autoimmunity Experiencing Reproductive Failure. *J Reprod Immunol* 2017;124:62–70.
76. Monteleone P, Parrini D, Faviana P, i sur. Female infertility related to thyroid autoimmunity: The ovarian follicle hypothesis. *Am J Reprod Immunol* 2011;66:108–14.
77. Medenica S, Garalejic E, Arsic B, i sur. Follicular fluid thyroid autoantibodies, thyrotropin, free thyroxine levels and assisted reproductive technology outcome. *PLoS One* 2018;13:e0206652.
78. Undas A, Chojnowski K, Klukowska A, i sur. Determination and interpretation of MTHFR gene mutations in gynecology and internal medicine. *Pol Arch Intern Med* 2019;129:728–32.
79. Goyette P, Sumner JS, Milos R, i sur. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994;7:195–200.
80. Sibani S, Christensen B, O'Ferrall E, i sur. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat* 2000;15:280–7.
81. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol* 2009;578:3-22.
82. Frosst P, Blom HJ, Milos R, i sur. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111–3.

83. MacLean CA, Dimanlig M, Godfrey D, Madrigal L. The Fertility Effects of the C677T Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: A Cross-Site Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Hum Biol.* 2025;37(8):e70119.
84. Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, i sur. A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. *J Mol Med.* 2001;79:522–8.
85. Castro R, Rivera I, Ravasco P, i sur. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T and 1298A→C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. *QJM* 2003;96(4):297–303.
86. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169–72.
87. Castiglia P, Sanna V, Azara A i sur. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms in breast cancer: a Sardinian preliminary case-control study. *Int J Med Sci* 2019;16:1089-1095.
88. ALFRED. The ALlele FREquency Database [Internet]. New Haven (SAD): Yale University; [updated 2019; cited 2023 Jan 26]. Available from: <https://alfred.med.yale.edu/alfred/keywordsearch.asp>
89. Božović IB, Vraneković J, Čizmarević NS, i sur. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome. *Pediatr Int* 2011;53(4):546–50.
90. Yang R, Pu D, Tan R, Wu J. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms (C677T and A1298C) with thyroid dysfunction: A meta-analysis and trial sequential analysis. *Arch Endocrinol Metab* 2022;66(4):551–81.
91. Coppedè F. One-carbon metabolism and Alzheimer's disease: focus on epigenetics. *Curr Genomics* 2010;11:246–60.
92. Abu-Hassan DW, Alhourri AN, Altork NA, i sur. MTHFR gene polymorphisms in hypothyroidism and hyperthyroidism among Jordanian females. *Arch Endocrinol Metab* 2019;63:280–7.

93. Hustad S, Nedrebo BG, Ueland PM, i sur. Phenotypic expression of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism and flavin cofactor availability in thyroid dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1050–7.
94. Lu M, Peng K, Song LL, Liang P, Liang Y. Association between genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and risk of autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis. *Disease Markers* 2022;2022:4568145
95. Arakawa Y, Watanabe M, Inoue N, i sur. Association of polymorphisms in DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MTHFR and MTRR genes with global DNA methylation levels and prognosis of autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 2012;170:194–201.
96. Mao R, Fan Y, Zuo L, i sur. Association study between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and Graves' disease. *Cell Biochem Funct* 2010;28:585–90.
97. Pan DF, Zhang LJ, Ren YZ. Study of plasma homocystein level and methylene-tetrahydrofolate (MTHFR) gene polymorphism in the patients with hyper- and hypothyroidism. *Chin J Endocrinol Metab* 2004; 20:124–5.
98. Nedrebø BG, Nygård O, Ueland PM, Lien EA. Plasma total homocysteine in hyper- and hypothyroid patients before and during 12 months of treatment. *Clin Chem*. 2001; 47:1738-41.
99. Lien EA, Nedrebø BG, Varhaug JE, Nygård O, Aakvaag A, Ueland PM. Plasma total homocysteine levels during short-term iatrogenic hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:1049-53.
100. Diekman MJ, van der Put NM, Blom HJ, Tijssen JG, Wiersinga WM. Determinants of changes in plasma homocysteine in hyperthyroidism and hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001; 54:197-204.
101. Bamashmoos SA, Al-Nuzaily MA, Al-Meerri AM, Ali FH. Relationship between total homocysteine, total cholesterol and creatinine levels in overt hypothyroid patients. *Springerplus*. 2013; 30:2:423.
102. Kvaratskhelia T, Kvaratskhelia E, Kankava K, Abzianidze E. MTHFR gene C677T polymorphism and levels of DNA methyltransferases in subclinical hypothyroidism *Georgian Med News*. 2017;265:19–24

103. Lee JY, Kim NK, Cho YW, Lew H. Association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and susceptibility to Graves' ophthalmopathy. *Mol Med Rep.* 2016;14:2276-82.
104. Wang XP, Lin QD, Ma ZW, Zhao AM [C677T and A1298C mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in unexplained recurrent spontaneous abortion] *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2004;39:238–241.
105. Li XM, Zhang YZ, Xu YX, Jiang S [Study on the relationship of MTHFR polymorphisms with unexplained recurrent spontaneous abortion] *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2004;21:39–42.
106. Guan LX, Du XY, Wang JX, i sur. Association of genetic polymorphisms in plasminogen activator inhibitor-1 gene and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene with recurrent early spontaneous abortion. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2005;22:330–3.
107. Coulam CB, Jeyendran RS. Thrombophilic gene polymorphisms are risk factors for unexplained infertility. *Fertil Steril* 2009;91:1516–7.
108. Bianca S, Barrano B, Cutuli N, i sur. Unexplained infertility and inherited thrombophilia. *Fertil Steril* 2009;92:e4–5.
109. Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L, i sur. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction* 2006;131:395–401.
110. Cao Y, Xu J, Zhang Z, i sur. Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Gene* 2013;514:105–11.
111. Wen Y, He H, Zhao K. Thrombophilic gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2023;40:1533-1558.
112. Yang Y, Luo Y, Yuan J, i sur. Association between maternal, fetal and paternal MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms and risk of recurrent pregnancy loss: a comprehensive evaluation. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;293:1197–1211.

113. Dell'Edera D, L'Episcopia A, Simone F, Lupo MG, Epifania AA, Allegretti A. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss. *Biomed Rep.* 2018;8:172–175.
114. Zhu Y, Wu Z, Ye L, Li G, Zeng Y, Zhang Y; Prevalent genotypes of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in recurrent miscarriage and recurrent implantation failure. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35:1437-1442.
115. Wu H, Zhu P, Geng X i sur. Genetic polymorphism of MTHFR C677T with preterm birth and low birth weight susceptibility: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2017;295:1105-1118.
116. Chen DF, Hu YH, Yang F, i sur. Mother's and child's methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with preterm delivery and low birth weight. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2004;36:248–53.
117. Tiwari D, Bose PD, Das S, i sur. MTHFR (C677T) polymorphism and PR (PROGINS) mutation as genetic factors for preterm delivery, fetal death and low birth weight: a Northeast Indian population based study. *Meta Gene* 2015;3:31–42.
118. Paduch-Jakubczyk W, Dubińska M. The Role of Folic Acid and Its Derivatives in Reproductive Health. *Actual Gyn.* 2024;16:65-69
119. Rosen MP, Shen S, McCulloch CE, i sur. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with ovarian follicular activity. *Fertil Steril* 2007;88:632–8.
120. Twigt JM, Hammiche F, Sinclair KD, i sur. Preconception folic acid use modulates estradiol and follicular responses to ovarian stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:322–9.
121. Atik RB, Christiansen OB, Elson J, i sur. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open* 2018;2018:hoy004.
122. Bashford MT, Hickey SE, Curry CJ, i sur. Addendum: ACMG Practice Guideline: lack of evidence for MTHFR polymorphism testing. *Genet Med* 2020;22:2125.
123. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin No. 138: Inherited thrombophilias in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013;122:706–17.
124. Dai C, Fei Y, Li J, Shi Y, Yang X. A novel review of homocysteine and pregnancy complications. *Biomed Res Int* 2021;2021:6652231.

125. Budzynska E, Olsyak-Wasik K, Borowiec M, Moczulska H. MTHFR gene polymorphisms and serum homocysteine concentration in women with recurrent miscarriages. *J Pre Clin Clin Res* 2024;18:109–13.
126. Levenseller Levin B, Varga E. MTHFR: addressing genetic counseling dilemmas using evidence-based literature. *J Genet Couns* 2016;25:901–11.
127. Zeng H, Liu Z, Zhang L, Liu N. MTHFR 677TT is associated with decreased number of embryos and cumulative live birth rate in patients undergoing GnRHa short protocol: a retrospective study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2022;22:170.
128. Wang X, Sun X, Tang B, Liu L, Feng X. Effect of polymorphisms of MTHFR in controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis, *J Assist Reprod Genet.* 2021; 38:2237-2249.
129. Ye F, Zhang S, Qi Q, Zhou J, Du Y, Wang L. Association of MTHFR 677C>T polymorphism with pregnancy outcomes in IVF/ICSI-ET recipients with adequate synthetic folic acid supplementation. *BioScience Trends.* 2022;16:282–290.
130. Ledowsky C, Steel A, Schloss J. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphisms and the risk of infertility in couples accessing assisted reproductive technologies: a systematic review. *Adv Integr Med* 2021;8:220–9.
131. Rah H, Jeon YJ, Choi Y, i sur. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677C>T) and thymidylate synthase (TSER and TS 1494del6) polymorphisms with premature ovarian failure in Korean women. *Menopause* 2012;19:1260–6.
132. Enciso M, Sarasa J, Xanthopoulou L, i sur. Polymorphisms in the MTHFR gene influence embryo viability and the incidence of aneuploidy. *Hum Genet* 2016;135:555–68.
133. Lu YJ, Li Q, Chen LX i sur. Association between maternal MTHFR C677T/A1298C combination polymorphisms and IVF/ICSI outcomes: a retrospective cohort study. *Hum Reprod Open* 2022;2023:hoac055.
134. Thaler CJ, Budiman H, Ruebsamen H, Nagel D, Lohse P. Effects of the common 677C > T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene on ovarian responsiveness to recombinant follicle-stimulating hormone. *Am J Reprod Immunol.* 2006; 55:251-258

135. Hecht S, Pavlik R, Lohse P, Noss U, Friese K, Thaler C.J. Common 677C > T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects follicular estradiol synthesis. *Fertil Steril*.2009;91:56-61.
136. Pavlik R, Hecht S, Ochsenkühn R, Noss U, Lohse P, Thaler C.J. Divergent effects of the 677C>T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene on ovarian responsiveness and anti-Müllerian hormone concentrations, *Fertil Steril*. 2011;7:2257-2262.
137. Simur A, Ozdemir S, Acar H i sur. Repeated in vitro fertilization failure and its relation with thrombophilia. *Gynecol Obstet Invest*. 2009; 67:109-12.
138. Shahrokhi SZ, Kazerouni F, Ghaffari F, Hadizadeh M, Zolfaghary Z. The effect of A1298C polymorphism of the MTHFR gene on anti-Müllerian hormone levels: experimental and web-based analysis. *J Clin Lab Anal* 2021;35:e23948.
139. Sanghavi PM, Chandel D. MTHFR (C677T) polymorphism and its association with cytogenetic and clinical profile in individuals with primary amenorrhea. *Egypt J Med Hum Genet* 2024;25:5.
140. Queiroz D’Elia P, Amaro dos Santos A, Bianco B i sur. MTHFR polymorphisms C677T and A1298C and associations with IVF outcomes in Brazilian women. *Reprod Biomed Online*. 2014;28:733–738.
141. ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reprod Biomed Online*. 2017;35:494-510.
142. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine . Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2020;114:1151–1157
143. Gardner, D.K.; Schoolcraft, W.B. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*. 1999;11,307–311.
144. Sun Y, Fang Y, Xu M, Liu Y. Relationship between thyroid antibody levels and ovarian reserve function in infertile chinese women with normal thyroid-stimulating hormone. *J Ovarian Res*. 2023 18;16:100.

145. Wei SX, Wang L, Liu YB, Fan QL, Fan Y, Qiao K. TPOAb positivity can impact ovarian reserve, embryo quality, and IVF/ICSI outcomes in euthyroid infertile women. *Gynecol. Endocrinol.* 2023;39:2266504.
146. Hasegawa Y, Kitahara Y, Osuka S, Tsukui Y, Kobayashi M, Iwase A. Effect of hypothyroidism and thyroid autoimmunity on the ovarian reserve: A systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2021;21:e12427.
147. Huang N, Liu D, Lian Y, Chi H, Qiao J. Immunological Microenvironment Alterations in Follicles of Patients with Autoimmune Thyroiditis. *Front. Immunol.* 2021;12:770852.
148. Zhang Y, Zhang Y, Su Z i sur. Impaired embryo development potential associated with thyroid autoimmunity in euthyroid infertile women with diminished ovarian reserve *Front. Endocrinol.* 2024;15:1376179
149. Herman, T.; Török, P.; Laganà, A.S.; Chiantera, V.; Venezia, R.; Jakab, A. Hashimoto's Thyroiditis Negatively Influences Intracytoplasmic Sperm Injection Outcome in Euthyroid Women on T4 Substitution Therapy: A Retrospective Study. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2024;89:150–158.
150. Lu Y, Wu S, Zhang X, Zhang X, Li X, Tan J. Thyroid autoimmunity is strongly associated with embryo quality in infertile euthyroid woman receiving IVF/ICSI, especially patients with TSH values above 2.5 uIU/ml and poor ovarian reserve. *BMC Pregnancy and Childbirth.* 2025; 25:1020
151. Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM i sur. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Human Reproduction Update.* 2007;13:225–238
152. Nelen WL. Hyperhomocysteinemia and human reproduction. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38:1011–1016.
153. Marci R, Lisi F, Soave I i sur. Impact of 677C>T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase on IVF outcome: is screening necessary for all infertile women? *Genet Test Mol Biomarkers* 2012;16:1011–1014.
154. Dobson AT, Davis RM, Rosen MP i sur. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C variants do not affect ongoing pregnancy rates following IVF. *Hum Reprod* 2007;22:450–456.

155. Laanpere M, Altmäe S, Kaart T, Stavreus-Evers A, Nilsson TK, Salumets A.. Folate-metabolizing gene variants and pregnancy outcome of IVF. *Reprod Biomed Online* 2011;22:603–614.
156. Haggarty P, McCallum H, McBain H i sur. Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation: prospective cohort study. *Lancet* 2006;367:1513–1519.
157. Xu Y, Ban Y, Ran L i sur. Relationship between unexplained recurrent pregnancy loss and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase) polymorphisms. *Fertil Steril* 2019;111:597–603

ILUSTRACIJE

Popis tablica

Tablica 1. Najčešći polimorfizi i genotipovi *MTHFR* gena

Tablica 2. Slijedovi nukleotida specifičnih početnica i veličine PCR produkata korištenih za analizu *MTHFR* polimorfizama

Tablica 3. Sadržaj PCR reakcijske smjese za analizu *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama

Tablica 4. Uvjeti PCR reakcija za analizu *MTHFR* polimorfizama

Tablica 5. Sadržaj reakcijskih smjesa za restrikciju polimorfizama gena *MTHFR*

Tablica 6. Vrste restrikcijskih enzima, uvjeti restrikcije i veličine restrikcijskih fragmenata korištenih za analizu *MTHFR* polimorfizama

Tablica 7. Osnovne karakteristike ispitanica, vrijednosti TSH, spolnih hormona i antitijela štitnjače

Tablica 8. Doza gonadotropina za stimulaciju jajnika i vrsta oplodnje

Tablica 9. Ishodi ovarijske stimulacije

Tablica 10. Ishodi oplodnje MII oocita i kulture zametka

Tablica 11. Distribucija *MTHFR* C677T genotipova u AIT-1 i AIT-2 podskupini

Tablica 12. Distribucija *MTHFR* A1298C genotipova u AIT-1 i AIT-2 podskupini

Tablica 13. Distribucija složenog heterozigotnog genotipa *MTHFR* C677T CT / A1298C AC u AIT-1 i AIT-2 podskupini

Tablica 14. Genotipovi *MTHFR* polimorfizama i kvantitativni ishodi ovarijske stimulacije i oplodnje oocita analizirani linearnim regresijskim modelom u podskupini AIT-1

Tablica 15. Genotipovi *MTHFR* polimorfizama i razvoj zametaka u kulturi analizirani linearnim regresijskim modelom u podskupini AIT-1

Tablica 16. Genotipovi *MTHFR* polimorfizama i kvantitativni ishodi ovarijske stimulacije i oplodnje oocita analizirani linearnim regresijskim modelom u podskupini AIT-2

Tablica 17. Genotipovi *MTHFR* polimorfizama i razvoj zametaka u kulturi analizirani linearnim regresijskim modelom u podskupini AIT-2

Tablica 18. Ishodi ovarijske stimulacije, oplodnje i kulture zametaka za C677T polimorfizam analizirani nezavisnim t testom (Welch t test) u podskupini AIT-1

Tablica 19. Ishodi ovarijske stimulacije, oplodnje i kulture zametaka za A1298C polimorfizam analizirani nezavisnim t testom (Welch t test) u podskupini AIT-1

Tablica 20. Ishodi ovarijske stimulacije, oplodnje i kulture zametaka za C677T polimorfizam analizirani nezavisnim t testom (Welch t test) u podskupini AIT-2

Tablica 21. Ishodi ovarijske stimulacije, oplodnje i kulture zametaka za A1298C polimorfizam analizirani nezavisnim t testom (Welch t test) u podskupini AIT-2

Popis slika

- Slika 1. MTHFR genotipovi i enzimsko aktivnost
- Slika 2. Dijagram tijeka istraživanja
- Slika 3. Udio ispitanica prema životnoj dobi
- Slika 4. Prosječna dob ispitanica prema skupinama uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 5. Prosječna koncentracija TSH uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 6. Prosječna koncentracija FSH uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 7. Prosječna koncentracija AMH uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 8. Prosječna koncentracija E2 uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 9. Udio pozitivnih Anti-TPO po podskupinama ispitanica
- Slika 10. Prosječna koncentracija Anti-TPO uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 11. Udio pozitivnih Anti-Tg po podskupinama
- Slika 12. Prosječna koncentracija Anti-Tg uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 13. Prosječna doza primjenjenog FSH (IU) za stimulaciju jajnika uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 14. Način oplodnje jajnih stanica u podskupinama.
- Slika 15. Prosječni broj ukupno aspiriranih oocita uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 16. Prosječni udio MII oocita uz interval pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 17. Prosječni udio MI oocita uz interval pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 18. Prosječni udio artritčnih oocita uz interval pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 19. Prosjek udjela pojedinih vrsta oocita u podskupinama uz interval pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 20. Prosječni broj oplodjenih MII oocita uz intervale pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 21. Prosječni udio zametaka u razvoju 3.dan uz interval pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 22. Prosječni udio razvijenih blastocisti uz interval pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)
- Slika 23. Prosječni udio oplodjenih oocita i razvijenih zametaka prema podskupinama uz interval pouzdanosti ($\alpha = 95\%$)

POPIS POKRATA

ACMG	Američko društvo za medicinsku genetiku (engl. American College of Medical Genetics)
ACOG	Američko društvo za opstetriciju i ginekologiju (engl. American College of Obstetricians and Gynecologists)
ADCC	Stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (engl. Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity)
AFC	Broj antralnih folikula (engl. Antral Follicle Count)
AIT	Autoimuni tireoiditis
AMH	Anti-Müllerov Hormon
ANA	Antinuklearna antitijela
Anti-Tg	Antitijela na tireoglobulin
Anti-TPO	Antitijela na tireoidnu peroksidazu
aPL	Antifosfolipidna antitijela
ATA	Američko udruženje za štitnjaču (engl. American Thyroid Association)
ATAt	Antitireoidna antitijela
COC	Kumulus-oocita kompleks
E2	Estradiol
ESHRE	Europsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju (engl. European Society of Human Reproduction and Embryology)
ETA	Europsko društvo za štitnjaču (engl. European Thyroid Association)
FT3	Slobodni trijodtironin (engl. Free T3)
FSH	Folikul stimulirajući hormon
GV	Germinativni vezikul
hCG	Humani korionski gonadotropin
ICSI	Intracitoplazmatska injekcija spermija
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-10	Interleukin 10
IL-17	Interleukin 17
INF- γ	Interferon γ
IVF	<i>In vitro</i> fertilizacija
LH	Luteinizirajući hormon
LT4	Levotiroksin

MI	Metafaza I
MII	Metafaza II
MPO	Medicinski pomognuta oplodnja
MTHFR	Metilentetrahidrofolat reduktaza
N	Broj ispitanica
NK	Prirodno ubilačke stanice (engl. natural killer cells)
NKT	Prirodno ubilačke T stanice (engl. natural killer Tcells)
OR	Ovarijska rezerva
PCR	Lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction)
POI	Prijevremena ovarijska insuficijencija
RFLP	Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (engl. restriction fragment length polymorphism)
SNP	Polimorfizam jednog nukleotida (engl. single nucleotide polymorphisms)
Tg	Tireoglobulin
Th1	Pomoćničke T stanice
TPO	Tireoidna peroksidaza
TSH	Tiroidni stimulirajući hormon (Tireotropin)

ŽIVOTOPIS

Ime i prezime	Tina Sušan Šepić
Adresa	Nova cesta 24 G, Opatija
Telefon	+385989003550
E-pošta	tinass@uniri.hr
Nacionalnost	Hrvatica
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum i mjesto rođenja	03.kolovoza 1981., Rijeka, Hrvatska

RADNO ISKUSTVO

- Datum: veljača 2021. - danas
- Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja: Medicinski fakultet u Rijeci
- Vrsta posla ili područje: Katedra za ginekologiju i opstetriciju
- Zanimanje i položaj koji obnaša: Asistent
-
- Datum: ožujak 2020. – danas
- Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja: Klinički bolnički centar Rijeka
- Vrsta posla ili područje: Klinika za ginekologiju i porodništvo
- Zanimanje i položaj koji obnaša: Liječnik specijalist savjetnik ginekologije i porodništva, uži specijalist humane reprodukcije i ginekološke endokrinologije

Datum: svibanj 2015. - ožujak 2020.

- Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja: Klinički bolnički centar Rijeka
- Vrsta posla ili područje: Klinika za ginekologiju i porodništvo
- Zanimanje i položaj koji obnaša: Liječnik specijalist ginekologije i porodništva

•Datum: 2013-2018.

- Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja: Medicinski fakultet u Rijeci
- Vrsta posla ili područje: Katedra za ginekologiju i opstetriciju
- Zanimanje i položaj koji obnaša: Naslovni asistent

Datum: listopad 2007. - svibanj 2015.

- Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja: Klinički bolnički centar Rijeka
- Vrsta posla ili područje: Klinika za ginekologiju i porodništvo
- Zanimanje i položaj koji obnaša: liječnik opće medicine na specijalizaciji

Datum: lipanj 2007. - rujan 2007.

- Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja: Dom Zdravlja PGŽ-a,
- Vrsta posla ili područje: Zavod za hitnu medicinu; Hitna medicinska pomoć Krk

- Zanimanje i položaj koji obnaša: liječnik opće medicine u hitnoj pomoći Krk

Datum: 2006.- 2007.

- Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja: Automotodrom Grobnik
- Vrsta posla ili područje: služba medicinskog osiguranja Automotodroma Grobnik
- Zanimanje i položaj koji obnaša: liječnik opće medicine
- Osnovne aktivnosti i odgovornosti : služba medicinskog osiguranja

Datum: 2005. - 2006.

- Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja: Klinika za ortopediju i traumatologiju Lovran
- Vrsta posla ili područje: pripravnički staž
- Zanimanje i položaj koji obnaša: liječnik opće medicine na stažu
- Osnovne aktivnosti i odgovornosti : pripravničko stažiranje u KBC Rijeka

ŠKOLOVANJE I IZOBRAZBA

- Datum 2017. – 2020.
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove: Klinika za ginekologiju i porodništvo
- Osnovni predmet /zanimanje: Uža specijalizacija iz humane reprodukcije i ginekološke endokrinologije
- Naslov postignut obrazovanjem: Uži specijalist humane reprodukcije i ginekološke endokrinologije

- Datum 2007. – 2015.
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove: Klinika za ginekologiju i porodništvo
- Osnovni predmet /zanimanje: Specijalizacija iz ginekologije i porodništva
- Naslov postignut obrazovanjem: Specijalist ginekologije i porodništva
- Datum 2009. -
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove: Medicinski fakultet u Rijeci
- Osnovni predmet /zanimanje: Poslijediplomski sveučilišni studij Biomedicina

- Datum 1999. - 2005.
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove: Medicinski fakultet u Rijeci
- Osnovni predmet /zanimanje: Studij medicine
- Naslov postignut obrazovanjem: Doktor medicine

- Datum 1995. – 1999.
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove: Prva riječka hrvatska gimnazija u Rijeci (Hrvatska)
- Osnovni predmet/zanimanje: Opća gimnazija

STRANI JEZICI Engleski, Talijanski, Španjolski

SOCIJALNE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI timski rad i suradnja s kolegama, edukacija i rad sa studentima, komunikacija s pacijentima, oralne prezentacije, pozitivan stav prema radnim zadacima, kontinuirano učenje

POSILIJEDIPLOMSKA EDUKACIJA I USAVRŠAVANJE

2019. ESHRE Campus “The ESHRE Guideline on Ovarian Stimulation: do we have agreement?”
Barcelona, Španjolska
2017. Poslijediplomski tečaj “Kontroverze u humanoj reprodukciji, ginekološkoj endokrinologiji, kontracepciji i medicini u menopauzi”, Zagreb
2015. Poslijediplomski specijalistički studij - Ginekologija i opstetricija
2014. Poslijediplomski tečaj “ Obesity- metabolic and nutritional problem in Western and Eastern Europe, Opatija
2014. Međunarodni tečaj: Personalizirana medicina: novi medicinski i društveni izazovi, Opatija
2011. Poslijediplomski tečaj “ Mjesto i uloga kolposkopije u ranoj dijagnozi i prevenciji neoplastičnih promjena vrata maternice i donjeg genitalnog trakta”, Zagreb
2011. Poslijediplomski tečaj “Hitna stanja u ginekologiji, opstetriciji i anesteziologiji”, Zagreb
2009. Poslijediplomski tečaj ginekološke kirurgije i endoskopije s međunarodnim sudjelovanjem „Kurt Semm“, Zabok
2006. Instruktorski tečaj : Generic Instructor Course; European Resuscitation Council, Rijeka

ZNANSTVENI ČLANCI CITIRANI U WoS/SCOPUS BAZI PODATAKA

1. **Sušanj Šepić, Tina**; Čavlović, Kristina; Dević Pavlić, Sanja; Smajla, Nataša; Višnić, Alenka; Radojčić Badovinac, Anđelka; Smiljan Severinski, Neda Thyroid Autoimmunity Impairs Oocyte Maturation, Fertilization, and Embryo Development in Assisted Reproductive Technology in Euthyroid Infertile Patients // Journal of clinical medicine, 14 (2025), 10; 3385-3385. doi: 10.3390/jcm14103385
2. S Dević Pavlić, L Saftić Martinović, **T Sušanj Šepić**, A Radojčić Badovinac Comparative Analysis of Controlled Ovarian Hyperstimulation and Modified Natural Cycle Protocols on Gene Expression and Quality of Oocytes, Zygotes, and Embryos in Assisted Reproductive Technology (ART) International journal of molecular sciences 25 (24), 13287
3. Višnić, Alenka; Barišić, Dubravko; Čanadi Jurešić, Gordana; **Sušanj Šepić, Tina**; Smiljan Severinski, Neda Identification of urine biomarkers of endometriosis—Protein mass spectrometry // American journal of reproductive immunology, 91 (2024), 5; 13856, 8. doi: 10.1111/aji.13856
4. **Tina, Sušanj Šepić** ; Neda, Smiljan Severinski, Senija, Eminović ; Anđelka, Radojčić Badovinac, Alenka, Višnić Complete restoration of fertility in a patient treated for androgen-secreting granulosa cell tumor- Case report // Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida, (2023), doi: 10.5935/1518-0557.20230027
5. Višnić, Alenka ; Barišić, Dubravko ; Čanadi Jurešić, Gordana ; Klarić, Marko ; **Sušanj Šepić, Tina** Concentration of total proteins in urine as a non- invasive biomarker of endometriosis //

Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida, 27 (2023), 4; 624-628. doi: 10.5935/1518-0557.20230028

6. Višnić, Alenka ; Smiljan Severinski, Neda ; Čanadi Jurešić, Gordana ; Smajla, Nataša ; **Sušanj Šepić, Tina** Protein CYFRA 21-1 kao potencijalni marker endometrioze // Medicina Fluminensis, 59 (2023), 3; 251-255. doi: 10.21860/medflum2023_306342

7. Višnić, Alenka ; Čanadi Jurešić, Gordana ; Domitrović, Robert ; Klarić, Marko ; **Sušanj Šepić, Tina**; Barišić, Dubravko Proteins in urine - possible biomarkers of endometriosis // Journal of reproductive immunology, 157 (2023), -; 103941, 10. doi: 10.1016/j.jri.2023.103941

8. **Sušanj, Tina** ; Šimunović, Ivana ; Smiljan Severinski, Neda Ishod trudnoća i poroda u mladih i starih prvorotkinja // Medicina : glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora, Podružnica Rijeka, 44 (2008), 3-4; 303-306

KONGRESNA PRIOPĆENJA

1. T. Jurić, M.T. Hajak, M. Pranjić, N. Smajla, **T. Sušanj Šepić**, A. Višnić, N. Smiljan Severinski; Analysis of genetic factors of coagulation in infertile patients; 15. Hrvatski kongres o ginekološkoj endokrinologiji, humanoј reprodukciji i menopauzi i 8. kongres Hrvatskog društva kliničkih embriologa s međunarodnim sudjelovanjem Opatija, Hrvatska, 11.09.2025-13.09.2025

2. Saftić Martinović L, Fornal E, Stachniuk A, Nikolaichuk H, Kristina Čavlović, **Tina Sušanj Šepić**; Neda Smiljan Severinski, Radojčić Badovinac A, Devic Pavlic S; P-153 Metabolomic Differences in Follicular Fluid: A Comparison of Modified Natural and Stimulated IVF Cycles; 41st ESHRE Meeting, Paris, 29.6.-2.7.2025

3. Višnić, Alenka; Čanadi Jurešić, Gordana; Domitrović, Robert; Klarić, Marko; **Sušanj Šepić, Tina**; Barišić, Dubravko. Proteins in urine - Possible biomarkers of endometriosis // 2nd International Conference on Women's Health, Gynecology and Polycystic Ovary Syndrome London, Ujedinjeno Kraljevstvo, 07.08.2023-08.08.2023

4. Višnić, Alenka; **Sušanj Šepić, Tina**; Klarić, Marko; Barišić, Dubravko Protein CYFRA 21-1 u urinu i antigen CA 125 u serumu – biomarkeri endometrioze // 14. Hrvatski kongres o ginekološkoj endokrinologiji, humanoј reprodukciji i menopauzi / 7. kongres Hrvatskog društva kliničkih embriologa Opatija, Hrvatska, 14.09.2023-16.09.2023

5. Višnić, Alenka; Smiljan Severinski, Neda; Barišić, Dubravko; **Sušanj Šepić, Tina**; Smajla, Nataša. Proteini u urinu medijatori endometrioze // 6.Hrvatski kongres o reprodukcijskom zdravlju, planiranju obitelji, kontracepciji i IVF-u s međunarodnim sudjelovanjem Šibenik, Hrvatska, 19.05.2022-21.05.2022

6. Višnić, Alenka; Smiljan Severinski, Neda; Čanadi Jurešić, Gordana; **Sušanj Šepić, Tina**. Uloga citokeratina 19-9 u etiopatogenezi endometrioze // 13. Hrvatski kongres o ginekološkoj endokrinologiji, humanoј reprodukciji i menopauzi i 6. kongres Hrvatskog društva kliničkih embriologa s međunarodnim sudjelovanjem Opatija, Hrvatska, 09.09.2021-11.09.2021

7. N.Vuletić, E.Eškinja, A-M Kelečić, **T. Sušanj Šepić**, N. Smiljan Severinski, H.Haller. Trombofilija i liječenje neplodnosti postupcima medicinski pomognute oplodnje. 8.Hrvatski kongres ginekologa i opstetričara s međunarodnim sudjelovanjem-Vodice, 16.-19. svibnja 2019.g.

8. Sušanj Šepić, Tina; Brnčić Verbić, Petra; Bačić, Roberta; Čavlović, Kristina; Smiljan Severinski, Neda Povezanost CASA parametara u ocjeni kvalitete sjemeni i ishoda liječenja postupkom intrauterine inseminacije zbog blaže muške neplodnosti. // 7. Hrvatski kongres ginekologa i opstetričara Osijek, Hrvatska, 19.05.2016-22.05.2016

9. R. Bačić, N. Vuletić, A. Šopić Rahelić, E. Eškinja, **T. Sušanj Šepić**, V. Frančišković, N. Sindik, O. Petrović. Redukcija blizanačke trudnoće u trećem trimestru. XXIX. Perinatalni dani „Ante Dražančić” - Split , 21. - 24. listopada 2015.

10. **Sušanj, Tina**; Šimunović, Ivana; Smiljan Severinski, Neda. Tijek i ishod trudnoća i poroda u mladih i starih prvorotkinja // XXIV. perinatalni dani "Ante Dražančić" Zagreb, Hrvatska, 22.10.2008-25.10.2008

ČLANSTVA

European Society of Human Reproduction and Embryology

Hrvatsko društvo za ginekološku onkologiju

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatska liječnička komora

OSTALO

2004.-2005. Demonstrator na Katedri za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje;

1999.-2005. aktivni član IFMSA- CroMSIC-a (International Federation of Medical student) i FOSS-a (Fakultetski odbor svih studenata)

