

# Utjecaj starenja na neplodnost žena

---

Stiperski, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:068036>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-07**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Matea Stiperski**

# **Utjecaj starenja na neplodnost žena**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2020.**

Ovaj diplomski rad izrađen je u Sveučilišnoj klinici Vuk Vrhovac na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Doroteje Pavan-Jukić, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2019./2020.

## **POPIS KRATICA**

MPO - medicinski pomognuta oplodnja

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija

PCOS - sindrom policističnih jajnika (eng. polycystic ovary syndrome)

BMI - indeks tjelesne mase (eng. body mass index)

GnRH - gonadotropin-oslobađajući hormon (eng. gonadotropin-releasing hormone)

FSH - folikulostimulirajući hormon

IVF - in vitro fertilizacija (eng. in vitro fertilisation)

SRY - testis-determinirajući faktor (eng. sex determining region Y)

OMI - inhibitor sazrijevanja oocite (eng. oocyte maturation inhibitor)

LH - luteinizirajući hormon

E2 - estradiol

RFSH - receptor folikulostimulirajućeg hormona

DHT - dihidrotestosteron

AMH - Antimüllerov hormon

IGF - inzulinu sličan faktor rasta 1 (eng. insulin-like growth factor 1)

AFC - broj antralnih folikula (eng. antral follicle count)

TNF- $\alpha$  - faktor tumorske nekroze alfa (eng. tumor necrosis factor- $\alpha$ )

GDF-9 - faktor rasta / diferencijacije 9 (eng. growth differentiation factor 9)

BMP-15 - morfogenetski protein kosti 15 (eng. bone morphogenetic protein 15)

P4 - progesteron

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

ATP - adenzin trifosfat

mtDNA - mitohondrijska DNA

polgA - DNA polimeraza podjedinica gamma

POF - prijevremena insuficijencija jajnika (eng. premature ovarian failure)

FOXL2 - eng. forkhead box L2

SNP - jednonukleotidni polimorfizam (eng. single nucleotide polymorphism)

CNV - kopije broja varijacija (eng. copy number variations)

CYP1B1-4 - enzim citokrom P450 1B1

BCL2 - eng. B-cell lymphoma 2

8-OHdG - 8-hidroksideoksigvanozin

AGE - krajnji proizvodi glikacije (eng. advanced glycation end products)

E2R - receptor estradiola

P4R - progesteronski receptor

ICSI - intracitoplazmatska injekcija spermija (eng. intracytoplasmic sperm injection)

IUI - intrauterina inseminacija

hMG - humani menopauzalni gonadotropin

GIFT - prijenos gameta u jajovod (eng. gamete intrafallopian transfer)

ZIFT - prijenos zigote u jajovod (eng. zygote intrafallopian transfer)

PGD - preimplantacijska genska dijagnostika

OHSS - sindrom hiperstimulacije jajnika (eng. ovarian hyperstimulation syndrome)

POSEIDON - kriteriji za pacijente sa slabom prognozom u MPO-u (eng. patient oriented strategies encompassing individualized oocyte number)

FISH - fluorescentna in situ hibridizacija

qPCR - kvantitativna polimerazna lančana reakcija (eng. quantitative polymerase chain reaction)

aCGH - komparativna genomska hibridizacija na mikročipu (eng. array comparative genomic hybridization)

SNP-array - eng. single nucleotide polymorphism array

NGS - sekvenciranje druge generacije (eng. next-generation sequencing)

## SADRŽAJ

### 1. Sažetak

### 2. Summary

### 3. Uvod..... 1

### 4. Neplodnost..... 2

#### 4.1 Uzroci neplodnosti..... 4

##### 4.1.1 Ginekološki uzroci..... 5

##### 4.1.2 Debljina i mršavost..... 5

##### 4.1.3 Pušenje..... 6

##### 4.1.4 Alkohol..... 6

##### 4.1.5 Kofein..... 6

##### 4.1.6 Droge..... 6

##### 4.1.7 Štetni čimbenici na radnim mjestima..... 6

##### 4.1.8 Dob..... 6

### 5. Razvoj ovarija..... 11

### 6. Folikulogeneza..... 12

### 7. Ovarijsko starenje..... 15

#### 7.1 Smanjenje broja jajnih stanica..... 16

#### 7.2 Smanjenje kvalitete jajnih stanica..... 17

##### 7.2.1 Aneuploidija oocita..... 19

##### 7.2.2 Mejotičke greške..... 20

7.2.3 Diobeno vreteno.....	21
7.2.4 Kohezini.....	22
7.2.5 Centromere.....	23
7.2.6 Telomere.....	23
7.2.7 Mitochondriji.....	24
7.2.8 Granuloza stanice.....	25
<b>8. Uzroci ovarijskog starenja.....</b>	<b>25</b>
<b>8.1 Genetički čimbenici.....</b>	<b>25</b>
<b>8.2 Mikrookolišni čimbenici.....</b>	<b>27</b>
8.2.1 Oksidativni stres.....	27
8.2.2 AGE proizvodi.....	28
8.2.3 Vaskularizacija.....	28
<b>8.3 Patološki čimbenici.....</b>	<b>29</b>
<b>8.4 Okolišni čimbenici.....</b>	<b>29</b>
<b>9. Starenje i reprodukcijaska endokrinologija.....</b>	<b>30</b>
<b>9.1. Izmijenjena pravilnost ciklusa.....</b>	<b>31</b>
<b>9.2 Neuroendokrinološke promjene.....</b>	<b>32</b>
<b>9.3 Promijenjeni ovarijski feedback.....</b>	<b>32</b>
<b>9.4. Utjecaj monotrofnog porasta FSH.....</b>	<b>33</b>
<b>10. Dijagnostika ovarijskog starenja.....</b>	<b>33</b>
<b>10.1 Ultrazvučni biljezi.....</b>	<b>33</b>

10.1.1 AFC.....	33
10.1.2 Volumen i vaskularizacija ovarija.....	34
<b>10.2 Endokrinološki biljezi.....</b>	<b>34</b>
10.2.1 Inhibin B.....	34
10.2.2 AMH.....	35
10.2.3 FSH.....	35
<b>10.3 Dinamički testovi.....</b>	<b>35</b>
10.3.1 Provokacijski test klomifen citratom.....	35
<b>11. Medicinski pomognuta oplodnja.....</b>	<b>38</b>
<b>11.1 Metode medicinski pomognute oplodnje.....</b>	<b>38</b>
11.1.1 Osnovne metode MPO.....	38
11.1.2 Metode koje poboljšavaju rezultate ili smanjuju rizik MPO-a.....	39
11.1.3 Metode MPO koje su etički manje prihvatljive.....	41
<b>11.2 Komplikacije MPO-a.....</b>	<b>41</b>
<b>11.3 MPO u žena starije dobi.....</b>	<b>42</b>
<b>11.4 Potencijalni novi pristupi liječenju neplodnosti u starijih žena u budućnosti.....</b>	<b>45</b>
<b>12. Zahvale</b>	
<b>13. Literatura</b>	
<b>14. Životopis</b>	



## SAŽETAK

### Utjecaj starenja na neplodnost žena

Matea Stiperski

U drugoj polovici 20. stoljeća su se dogodile mnoge kulturološke promjene koje su utjecale na živote žena. Posljedično, počela se povisivati srednja dob u kojoj rađaju djecu. Danas žene rađaju 4-5 godina kasnije nego prije 20 godina. Istovremeno se bilježi porast neplodnosti i smanjenja broja djece. U razvijenim zemljama, uključujući i Hrvatsku, zbog smanjenog broja djece dolazi do demografskog pada. Jedan od najučestalijih razloga neplodnosti je dob. Smanjenje plodnosti u prosjeku započinje u 31. godini, a 10 godina kasnije su žene neplodne. Uzrok prirodnog smanjenja plodnosti je ovarijsko starenje. To je postepeni proces smanjenja broja i kvalitete jajnih stanica. Žene se rađaju s konačnim brojem jajnih stanica koji se smanjuje kroz život. U vrijeme menarhe žene imaju oko 300-400 tisuća oocita, a do 35. godine je preostalo samo 25 000. Zajedno s padom broja folikula, smanjuje se i njihova kvaliteta. Glavni uzrok tome je porast nerazdvajanja homolognih kromosoma ili sestrinskih kromatida u mejozi zbog čega je češća aneuploidija oocita u žena starijih od 35 godina. Uzroci ovarijskog starenja su višestruki. Smatra se kako ulogu mogu imati geni, mikroklimatski uvjeti u ovarijama, bolesti ovarija i okolišni čimbenici. Dijagnostika ovarijskog starenja je dio rutinske pripreme za medicinski pomognutu oplodnju. Postoje ultrazvučna mjerenja broja antralnih folikula te volumena jajnika i protoka krvi u jajniku. Biokemijske pretrage uključuju mjerenje vrijednosti inhibina B, AMH-a i FSH-a. AMH je danas najbolji test ovarijske rezerve i starenja jer njegova razina u serumu izravno ovisi o broju malih antralnih folikula. Zbog porasta učestalosti neplodnosti, danas se u svijetu provede milijun IVF postupaka godišnje. U početku je bio slabi uspjeh IVF-a (1-5%), ali danas iznosi 50-60%. Uspješnost je najveća u žena mlađih od 30 godina. Starenjem se smanjuje uspjeh te je u 40-tima izrazito nizak.

Ključne riječi: neplodnost, ovarijsko starenje, oocite, IVF

## SUMMARY

### The impact of female age on infertility

Matea Stiperski

In the second half of the 20th century, many cultural changes happened which impacted women's lives. Consequently, the median age at which women bore children started to increase. Today, women have children 4-5 years later than they did 20 years ago. At the same time, infertility has increased and the number of children has decreased. In developed countries (including Croatia) there is population decline due to the decreased number of children. One of the most frequent reasons for infertility is age. Decrease in fertility starts at 31 on average and 10 years later women are typically infertile. The reason for natural decrease in fertility is ovarian ageing. This is a gradual decline in the number and quality of oocytes. Women are born with a definite number of oocytes, which decreases throughout life. At the time of menarche, women have 300-400 thousand oocytes and they only have 25,000 oocytes left when they are 35 years old. Simultaneously, with the decrease in the number of follicles, there is a decrease in their quality. The main reason for this is nondisjunction of homologous chromosomes or sister chromatids during meiosis, which results in higher incidence of aneuploidy of oocytes in women over age 35. Reasons for ovarian ageing are many. It is thought that genes, microclimate in ovaries, ovarian conditions, and environmental factors play parts in this. Diagnostics for ovarian ageing are a part of the routine preparation for medically assisted reproduction. There are ultrasound diagnostics for antral follicle count, ovarian volume, and ovarian blood flow. There are also biochemical tests for levels of inhibin B, AMH, and FSH in serum. AMH is the best test for ovarian ageing and ovarian reserve today because its level in serum is directly connected with the number of small antral follicles. Because of the increased incidence of infertility today, one million IVF procedures are conducted every year around the world. In the beginning, IVF had a low success rate (1-5%), but today it is 50-60% successful. Efficacy is the highest in women under 30 years old. Over the age of 40, the success rate is extremely low because of decreases associated with ageing.

Key words: infertility, ovarian ageing, oocytes, IVF

### 3.UVOD

Danas sve više žena rađa u kasnijoj životnoj dobi. U Europi rađaju prvo dijete 4 do 5 godina kasnije nego prije 20 godina (1). Prema Eurostatu prosječna životna dob žena prilikom prvog porođaja u državama Europske unije je 31,3 godine u 2018.godini, dok je u Hrvatskoj 30,9 godina. 5 godina ranije je iznosila 29,9 godina što ukazuje na brzi porast starosti roditelja u Hrvatskoj (2).

Ovaj trend je započeo 1980-tih u zapadnim zemljama kada se počela povisivati srednja dob žena u kojoj rađaju i istodobno se počeo smanjivati broj djece (3). Mnoge socioekonomske i kulturološke promjene u zadnjoj trećini 20. stoljeća poput porasta obrazovanog i zaposlenog udjela žena u društvu, ženske emancipacije, dostupnosti kontracepcije i planiranje roditeljstva zahvaljujući odgodi trudnoće dok ne bude ekonomski stabilna situacija objašnjavaju ovaj trend. Danas žene imaju potrebu ostvariti karijeru i ekonomsku stabilnost te također biti u pouzdanoj vezi prije nego postanu majke. Prema studijama su žene koje nakon 35. godine postaju majke više razine obrazovanja (VSS), imaju veće prihode, stabilan posao (trajni ugovor) te imaju stalnog partnera (4).

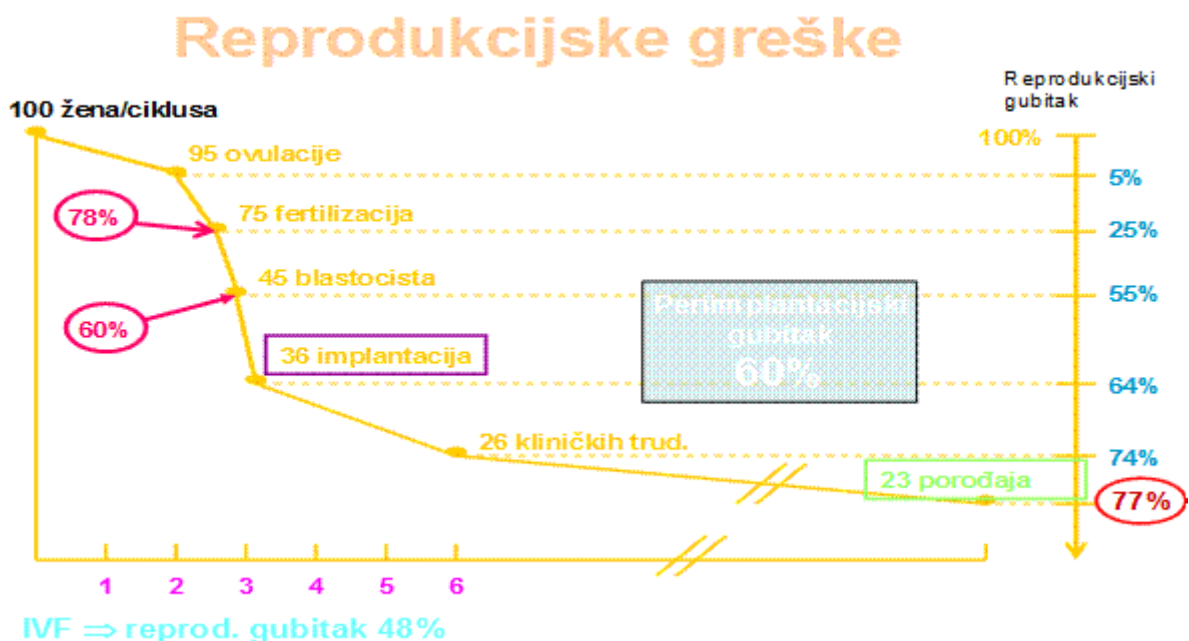
Također, mnoge žene koje odgađaju trudnoću smatraju kako medicinski pomognuta oplodnja može nadoknaditi smanjenje plodnosti koje se događa s godinama. Nažalost, to nije sasvim točno. Ako žene unutar par godina nisu uspjele zatrudnjeti prirodnim putem, MPO može nadoknaditi samo do 50% trudnoća između 30. i 35. godine te manje od 30% trudnoća između 35. i 40. godine. MPO ne može u potpunosti nadoknaditi prirodni pad fertiliteta nakon 35. godine (3).

Istovremeno s porastom dobi prvorotkinja, porasla je učestalost neplodnosti za 5-7% u Europi te posljedično bilježimo porast MPO liječenja za 10% godišnje (1). Također, porastom dobi majke linearni je porast vremena potrebnog da ostane trudna. Procijenjeno je kako je ženama mlađima od 35 godina potrebno 6,8 mjesečnih ciklusa, a starijima od 35 godina 10,9 ciklusa da zatrudne. Shodno tome starije žene rjeđe spontano zatrudne te češće traže medicinsku pomoć (4). Danas znamo kako je dob najvažniji odlučujući faktor ženske, ali i muške plodnosti te se naglo smanjuje nakon 35. godine za žene, odnosno 50. godine za muškarce (5).

## 4.NEPLODNOST

Neplodnost je nemogućnost postizanja trudnoće nakon jedne godine učestalih i nezaštićenih spolnih odnosa. Nije rijetka te stvara probleme 10-15% parova. Može se kategorizirati kao primarna, gdje nije bilo prijašnjih trudnoća i sekundarna, nakon barem jedne trudnoće ranije. Većina parova koja se smatra neplodnima je ustvari subfertilna te će uspjeti zatrudnjati nakon duljeg vremena. Unatoč tome, danas se smatra kako bi svaki par koji ne može postići trudnoću unutar jedne godine trebao javiti se liječniku radi evaluacije fertilitnosti. U nekim slučajevima bi se trebali javiti i ranije kao npr. u slučaju anovulacija ili upalnih bolesti zdjelice u anamnezi (6). Također, smatra se kako bi žene starije od 35 godina trebale već nakon 6 mjeseci neuspješnih pokušaja začeća javiti se liječniku (7).

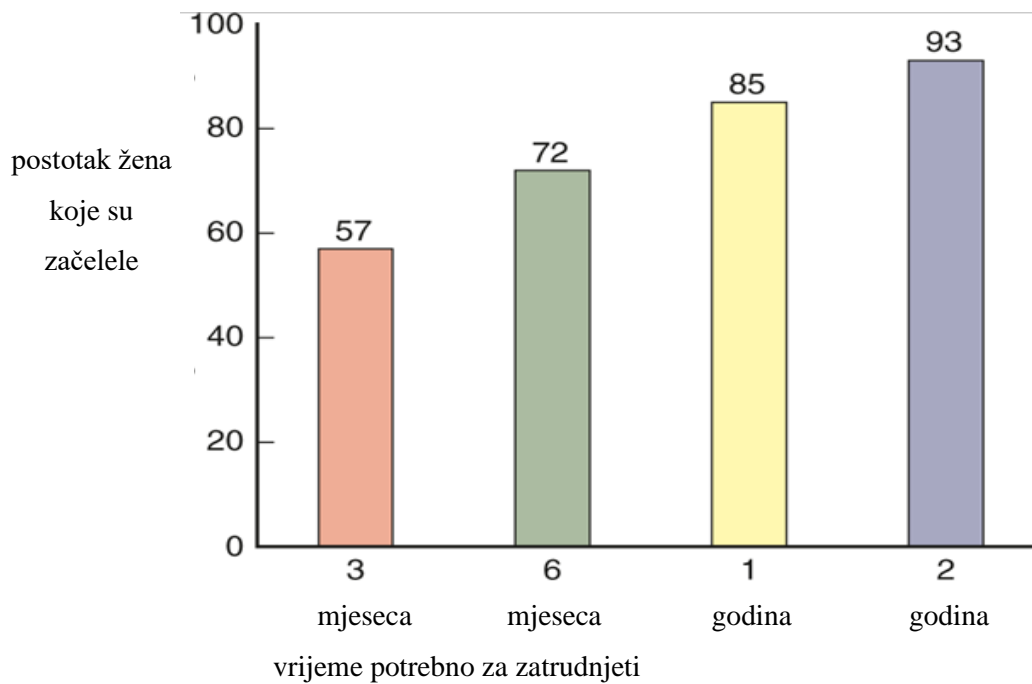
Fekunditet je izraz koji opisuje mogućnost začeća. Mjesečni fekunditet iznosi 20-25% što znači da će samo 25% parova ostvariti začeće (6).



Slika 1. Plodnost zdravih parova i postotak reprodukcijških grešaka (8)

U 100 mladih i zdravih parova doći će samo do 75 fertilizacija od kojih će se razviti 45 blastocista. Od tih blastocista samo će se 36 implantirati u maternici te će se zbog periimplantacijskih gubitaka razviti 26-28 kliničkih trudnoća. Na kraju će se roditi 23 djece od 100 parova koji su u tom ciklusu pokušavali

ostvariti trudnoću. To dokazuje da i u naizgled reproduktivno zdravih ljudi je visok reproduksijski gubitak (77%) (1).



Slika 2. Vrijeme potrebno za zatrudnjeti (6)

Prema podacima o fekunditetu žena, 57% će uspjeti začeti unutar 3 mjeseca, 72% za 6 mjeseci te 85% unutar jedne godine. Ipak, preostale žene nisu sve neplodne jer će 93% žena na kraju uspjeti zatrudnjeti nakon 2 godine (6). Na pad fekunditeta u žena utječu godine. Prema SZO-u najviši je između 20. i 27. godine te iznosi 20-30% (1). U žena se počinje smanjivati mjesečni fekunditet u prosjeku s 30 godina.



Slika 3. Ovisnost fekunditeta o dobi žene (9)

U grafu je prikazan fekunditet žena između 20. i 30. godine kao 1.00, tj. 100%. U žena s 33 godine mjesečni fekunditet iznosi 75% fekunditeta žena mlađih od 30 godina. U 35. godini fekunditet je upola manji nego u 20. desetljeću (9). U partnera je isto važna dob jer nakon 40. godine se smanjuje fekunditet i u muškaraca (1).

Fertilnost je pojam koji pokazuje koliko djece u prosjeku rodi žena u životu. Ako iznosi manje od 2, tj. svaka žena u prosjeku rodi manje od dvoje djece, umanjuje se demografska ravnoteža. U razvijenim zapadnim zemljama fertilnost iznosi 1,3 – 2, a u Hrvatskoj 1,38 zbog čega postoji demografski pad. Pad fertilnosti se može pripisati današnjem trendu u kojem žene sve kasnije rađaju. U prosjeku danas žene rađaju 4-5 godina kasnije nego prije dvadeset godina. U istom razdoblju raste neplodnost i liječenje medicinski pomognutom oplodnjom (1).

#### **4.1 Uzroci neplodnosti**

Uzrok neplodnosti u parova se može pripisati ženama u 1/3, muškarcima u 1/3 i oboje partnera u 1/3 slučajeva. Zato je jako važno u oba partnera provesti evaluaciju i dijagnostiku neplodnosti (6).

Najčešći razlozi neplodnosti žena su ovarijska disfunkcija s anovulacijama (25-35%), tubarni faktor (20-25%), endometrioza (10-20%), patologija uterusa (5-10%) i idiopatska neplodnost (20-30%) (7).

##### **4.1.1 Ginekološki uzroci**

Jedan od uzroka neplodnosti žena može biti ginekološki. Potrebna je temeljita anamneza s podacima o menstruaciji, kontracepciji te povijesti bolesti (npr. ovarijske ciste, endometrioza, lejomiomi, spolno prenosive bolesti i upale zdjelice). U slučaju sekundarne neplodnosti, trebaju se uzeti podaci o prethodnim trudnoćama i komplikacijama ako ih je bilo. Važni su i prijašnji abnormalni nalazi PAPA testa. Neophodno je uzeti podatke o učestalosti spolnih odnosa i duljini trajanja neplodnosti. Važni su i podaci o prethodnim operativnim zahvatima u zdjelici ili abdomenu jer su moguće komplikacije priraslice u zdjelici ili opstrukcija jajovoda. Prethodna povijest bolesti u obitelji je veoma važna. Žene s PCOS-om ili endometriozom u obitelji imaju veći rizik da i same obole. Također, neplodnost, pobačaji i fetalne anomalije u obitelji povišuju rizik u žena (6).

Uzroci neplodnosti u žena su upale spolnog sustava, endometriozna i adenomioza, abnormalna maternica, cervikalni faktor, posljedice kirurških zahvata te nerazjašnjena neplodnost. Danas je sve češća pojava kombinirane neplodnosti gdje postoji više uzroka neplodnosti. Zbog odgađanja trudnoće, povećava se učestalost debljine, epigenetike, ginekoloških bolesti i zahvata što pridonosi neplodnosti koja je najčešće kombinacija više navedenih faktora (1).

#### **4.1.2 Debljina i mršavost**

Različiti okolišni faktori također pridonose neplodnosti. Pretile i pothranjene žene imaju poteškoća zanijeti. BMI iznad 25 i ispod 17 dovodi do abnormalnosti u lučenju GnRH iz hipotalamusa i gonadotropina iz hipofize koji utječu na rad ovarija (6). Prekomjerno teške žene imaju dvostruko veću učestalost neplodnosti nego žene sa normalnim BMI-om. U Hrvatskoj je u svih neplodnih žena samo 37% žena s normalnim BMI-om. Zbog debljine su češće anovulacije, slabiji su rezultati IVF-a te je dvaput veći rizik spontanog pobačaja. Također, povećava rizike različitih komplikacija tijekom trudnoće te je povišen perinatalni mortalitet i morbiditet. Čak i manji gubitak kilograma (5-10% pad tjelesne težine) u pretilih žena normalizira cikluse i povećava vjerojatnost trudnoće. S druge strane, pretjerana mršavost zbog koje je udio masnog tkiva manji od 20% dovodi do anovulacija i amenoreja. Brzo mršavljenje, malnutricija i pretjerana tjelovježba su povezani s niskim fekunditetom i smanjenim uspjehom IVF-a. Prva mjera liječenja neplodnosti je porast tjelesne težine. Žene koje se udebljaju za 4-5 kg u visokom postotku uspješno zatrudne (1).

#### **4.1.3 Pušenje**

Pušenje i izloženost dimu je povezano s povećanom pojavom neplodnosti i duljim vremenom potrebnim za ostvarivanje trudnoće. Rizik od neplodnosti je u pušača za 60% viši nego u nepušača (1). Toksini u dimu ubrzavaju propadanje folikula u jajnicima i pridonose porastu genetičkih mutacija u gametama i ranim embrijima (6). Početak menopauze je prosjeku 2 godine ranije u pušača. Imaju smanjenu ovarijsku rezervu, više razine FSH-a i niži AMH nego nepušači (10). Mjesečni fekunditet je tri puta niži u pušača, tj. iznosi samo 8%. Imaju manji uspjeh IVF-a i veći rizik spontanog pobačaja (1).

#### **4.1.4 Alkohol**

Prečesto konzumiranje alkohola (više od 8 pića tjedno) umanjuje plodnost u žena za 20-30% te je također štetan za plod u ranoj trudnoći. Alkoholizam je povezan s anovulacijama i endometriozom. Pušenje zajedno s alkoholom ima sinergistički učinak na smanjenje fertiliteta (1).

#### **4.1.5 Kofein**

Veće količine kofeina (>250 mg/dan) su povezane s padom fekunditeta i produljenim vremenom do začeća. Za još veće količine (>500 mg/dan) je dokazan povećani rizik pobačaja (6).

#### **4.1.6 Droge**

Droge također utječu na fertilitet. Marihuana suprimira os hipotalamus-hipofiza-gonade (6).

#### **4.1.7 Štetni čimbenici na radnim mjestima**

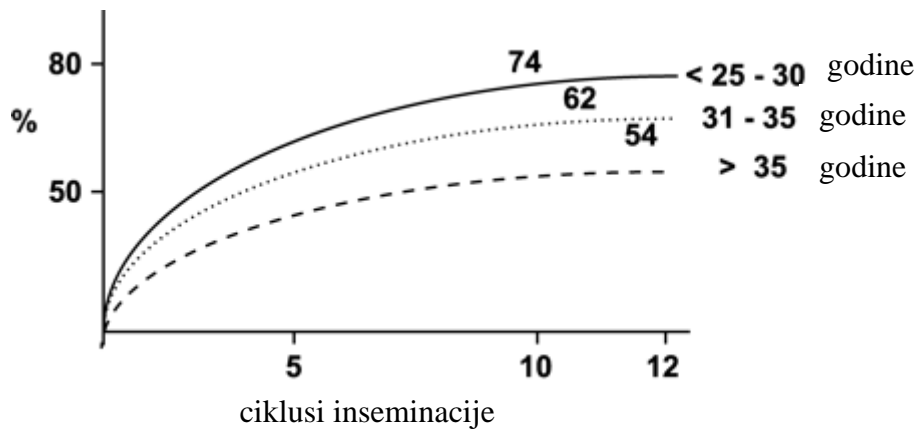
Određeni štetni čimbenici na radnim mjestima mogu utjecati na fertilitet. Teški metali i pesticidi smanjuju plodnost i povećavaju rizik pobačaja (6).

#### **4.1.8 Dob**

Jedan od najučestalijih razloga smanjenja fertiliteta je dob. Posebno danas kada mnoge žene odgađaju trudnoću za kasne tridesete u kojima je fekunditet manji nego u dvadesetima. U jednoj studiji su u zajednici huterita koji ne koriste kontracepciju bilježili učestalost neplodnosti u žena. U žena nakon 34. godine je 11% bilo neplodno, nakon 40. godine 33% te nakon 45. godine 87%. Ta studija je uz još neke ukazala na porast učestalosti neplodnosti s godinama. Danas se zna kako je glavni razlog tome smanjenje ovarijske rezerve (6).

Ne tako davno smatralo se kako do 35. godine su žene jednako plodne kao u 20-tima te tek s 35 godina započinje pad fekunditeta. 1982. godine provedena je studija koja je dokazala pad fekunditeta već s 30 godina. U njoj su sudjelovale žene čiji su supruzi imali azoospermiju te su u centrima za fertilitet bile inseminirane donorovim sjemenom.



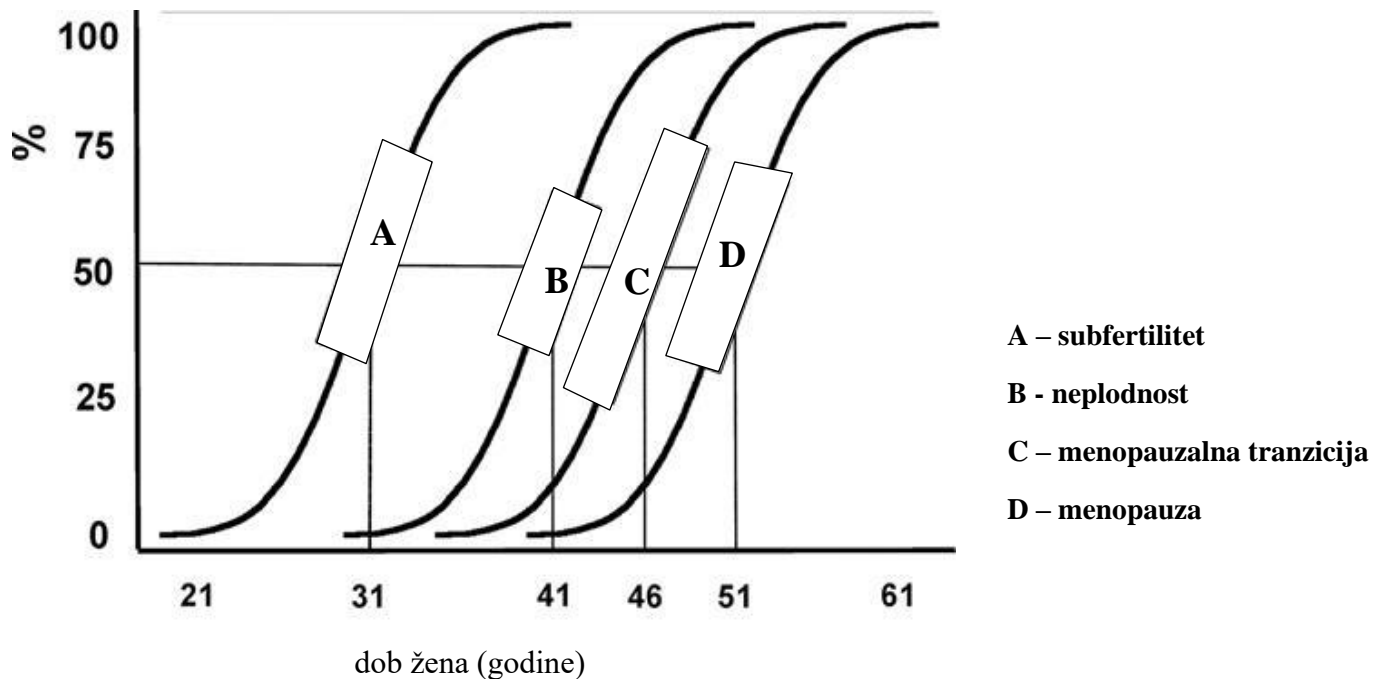


Slika 4. Kumulativni uspjeh inseminacije ovisno o dobnoj skupini žena (3)

Uspjeh inseminacije je bio 74% u dobnoj skupini od 25 do 30 godina. Između 31. i 35. godine se smanjio na 62% te nakon 35. godine na 54%. To ukazuje na značajni pad fertiliteta već nakon 30. godine u žena.

Uzrok pada fekunditeta s godinama je smanjeni broj i kvaliteta jajnih stanica. U starijih žena je mnogo češća aneuploidija nego u mlađih što vodi nemogućnosti implantacije i ranom gubitku trudnoće. Osim toga, neučestali spolni odnosi imaju ulogu u produženom vremenu potrebnom za začeće u žena do 39. godine. Dob partnera postane važna tek nakon 40. godine kada se smanjuje plodnost muškaraca. Drugi faktori poput starenja reproduktivnog trakta i maternice nisu toliko značajni (3).

Pomoću populacijskih studija postavila se hipoteza kako postoji točan vremenski period između važnih događaja reproduktivnog starenja.



Slika 5. Prikaz varijacija u dobi žene u različitim stadijima reproduktivnog starenja sa fiksnim vremenskim intervalom između stadija (9)

Smanjenje fertiliteti se u prosjeku javlja u 31. godini. 10 godina kasnije, tj. u 41. godini žene postaju neplodne. Neplodnost se u studijama gledala kao dob pri porodu posljednjeg djeteta u prirodno postignutoj trudnoći. Raspon pojave steriliteta je od 23. do 51. godine sa srednjom vrijednosti od 41 godine. Sljedeći događaj u reproduktivnom starenju je početak menopauzalne tranzicije koja traje sve do posljednje menstruacije. Taj period je obilježen neredovitim menstruacijama te produljenim ciklusima. U prosjeku započinje sa 46 godina, a raspon je od 34. do 54. godine. Posljednja menstruacija, tj. menopauza započinje između 40 i 60 godine u žena sa prosječnom vrijednosti od 51 godine. Unatoč individualnim razlikama u žena, postoji vremenska povezanost između ova 4 stadija reproduktivnog starenja (9).

U žena se uzroci neplodnosti razlikuju s godinama. U studiji koju su proveli Maheshwari i suradnici podijelili su žene koje su se javile radi nemogućnosti začeća u centar za fertilitet Aberdeen između 1993. i 2006. godine na mlađe od 35 godina i starije od 35 godina. U mlađih žena koje nisu mogle zatrudnjeti je mnogo češći razlog bio ovarijska disfunkcija nego u starijih (23,6% naspram 11,4%). Mogući razlog za to je što će se mlade žene sa nepravilnim ciklusima prije javiti u kliniku radi dijagnoze

i liječenja. Također, u mlađih žena je češći razlog neplodnosti endometriozna (4,5% naspram 3,1%). U starijih od 35 godina je češća idiopatska neplodnost (26,6% naspram 21,0%). Razlog može biti pad fertiliteta i ovarijsko starenje s godinama. Prema hipotezi o određenom vremenskom intervalu između početka smanjenja fertiliteta i menopauze, u žena se subfertilitet očekuje već s navršene 32 godine. Nakon 35 godina je po toj hipotezi većina žena subfertilna. Drugi uzroci neobjašnjive neplodnosti u starijih žena može biti debljina (viši BMI sa godinama), pušenje ili stres. Osim idiopatske neplodnosti, u žena iznad 35 godina je češći tubarni faktor (24,8 naspram 17,6%). Povećana učestalost tubarnog uzroka neplodnosti može biti radi prethodnih ektopičnih trudnoća gdje je rađena salpingektomija ili pelvičnih infekcija čija je veća vjerojatnost dobivanja kroz godine (11).

Stariji parovi su češće neplodni nego mlađi te se postavlja pitanje je li uzrok tome porast udjela sterilnih parova s godinama ili se radi o postepenom smanjenju fertiliteta u većine parova. U potrazi za odgovorom na to pitanje, Dunson i suradnici su proveli kohortnu studiju sa 782 naizgled zdrava para bez poznatih zdravstvenih problema sakupljenih iz 7 različitih europskih centara za fertilitet između 1992. i 1996. godine. Od ukupnog broja parova je 1% bilo neplodno (nemogućnost začeća bez medicinske pomoći) te se taj postotak nije mijenjao s godinama. S druge strane, smanjenje plodnosti je bilo uočljivo s porastom godina gdje su mlađe žene lakše ostale trudne nego starije. Unutar 12 mjeseci 8% žena između 19 i 26 godina nije uspjelo zatrudnjeti, 13-14% žena od 27. do 34. godine te 18% žena od 35. do 39. godine. Također, na pad fekunditeta utječe i muškarčeva dob nakon 35. godine. Prije 35 godina nema utjecaja, no u kasnim tridesetima smanjuje se fekunditet u muškaraca. 18% žena koje s 35 godina ne mogu zatrudnjeti unutar jedne godine raste na 28% ako je partner star 40 godina. Osim dobi, na neplodnost utječe i učestalost odnosa. Ovi podaci se odnose na parove koji su imali dva puta tjedno odnose. Ako se smanji učestalost na jednom tjedno, raste postotak nemogućnosti začeća. Razlog tome je veća vjerojatnost promašaja plodnih dana. Važno je napomenuti kako odnosi učestaliji od dva puta tjedno ne povećavaju postotak trudnoća (12).

Odgajanje trudnoće je postavilo nerealna očekivanja od medicinski pomognute oplodnje. U IVF-u je dob kritični faktor koji dovodi do slabog ovarijskog odgovora na stimulaciju. Koliko je dob presudna za uspjeh, pokazuju podaci živorođene djece pomoću IVF-a u UK 2007. godine gdje je stopa živorođene

djece iznosila 32,3% za majke mlađe od 35 godina te se smanjila na 11,9% za žene između 40. i 42. godine te na 3,4% između 43. i 44. godine. Očigledno je kako ni medicina ne može u potpunosti nadoknaditi plodnost izgublenu sa godinama (13).

Trudnoća u žena starijih od 40 godina nosi više rizika nego u mlađih žena. U velikoj studiji su uspoređene primipare starije od 40 godina i primipare mlađe od 40 godina. U starijoj skupini su zabilježeni češći usporeni rast fetusa (2.5% naspram 1.4%), asfiksija novorođenčeta (6% naspram 4%), malprezentacija (11% naspram 6%) te gestacijski dijabetes (7% naspram 1.7%). U starijih multipara su također češće komplikacije nego u mlađih, ali je razlika manje izražena nego između primipara. Novorođenčad žena iznad 40 godina su češće prijevremeno rođena (18% naspram 8%), niske porođajne težine <2500gr (11% naspram 4%) te primljena na intenzivni odjel (7% naspram 4%) nego novorođenčad mlađih žena. Starijim trudnicama moraju češće instrumentalno dovršiti vaginalni porod. Također, imaju viši postotak carskih rezova nego mlađe žene (47% naspram 23%). Pored ostaloga, dob utječe na povećanje kardiovaskularnog rizika u trudnoći te povećava vjerojatnost hipertenzije u trudnoći (1). Rizik spontanih pobačaja u žena iznad 40 godina iznosi 50 do 75% (6). Uz to je i viši perinatalni i maternalni mortalitet (1).

Postavila se hipoteza kako i uterus ima ulogu u smanjenju plodnosti sa starenjem. U komparativnoj studiji su UZV-om mjerili debljinu endometrija mlađim (22-34 godine) i starijim (≥45 godina) ženama. Nije bila pronađena razlika između te dvije skupine te do sada još nije detektiran uterini faktor starenja (14).

Uterus, tj. endometrij nije ograničavajući faktor u starijih žena. Egzogeno stimulacija estrogenom i progesteronom može pripremiti za implantaciju endometrij 63-godišnje žene u menopauzi. Čak i dugo nakon menopauze, uterus može nakon hormonske stimulacije biti spreman za implantaciju i ranu trudnoću. Ipak, kao i svi drugi organi, uterus stari sa godinama te mu se smanjuje vaskularizacija. U trudnoći je često nedostatna cirkulacija dodatno opterećenje za majčin organizam te posljedično stvara komplikacije u trudnoći (3).

## 5. RAZVOJ OVARIJA

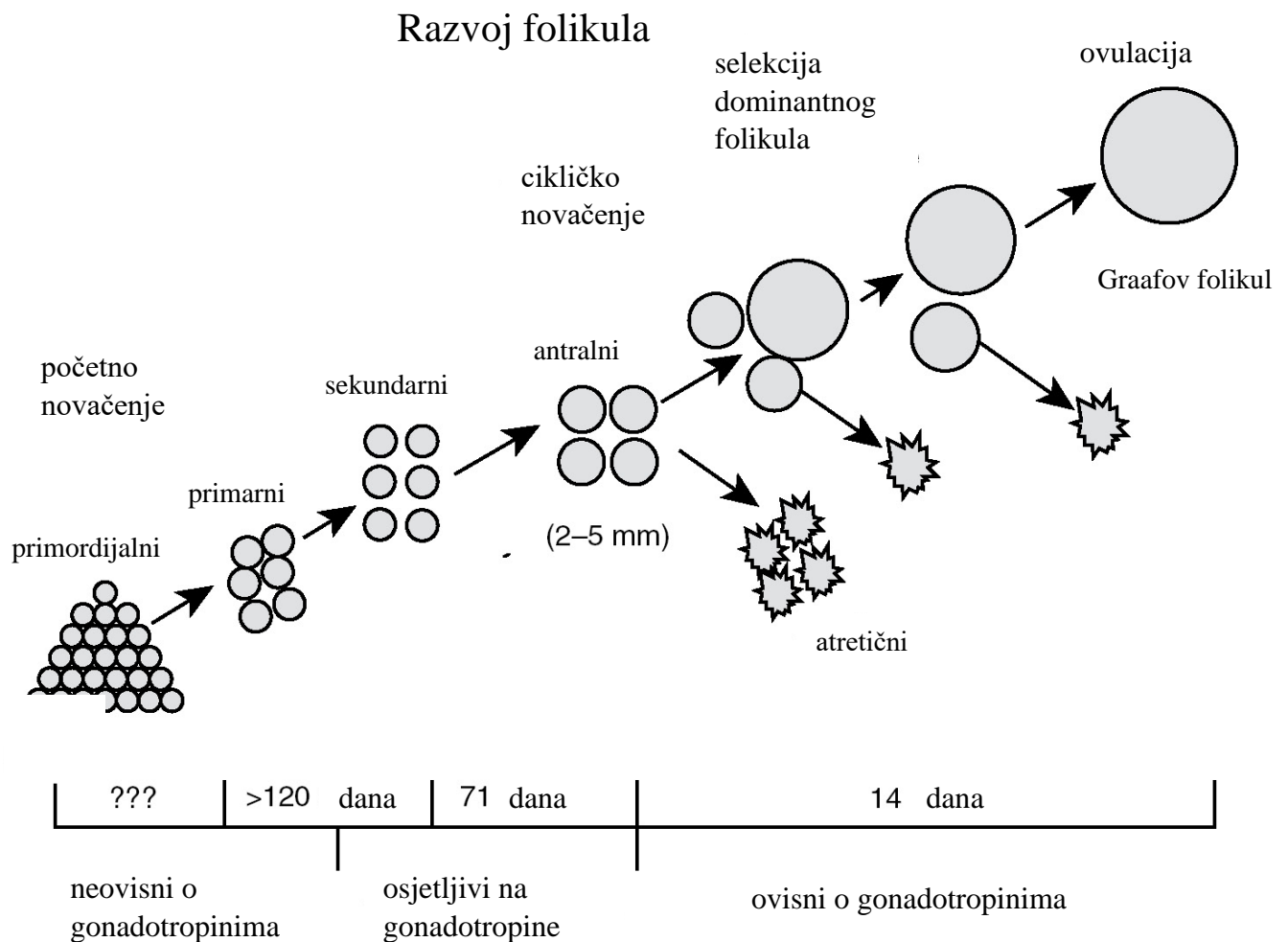
Genetski spol određuje spermij koji oplodi jajnu stanicu ovisno sadrži li X ili Y kromosom. Na Y kromosomu se nalazi gen determinacije testisa SRY gen koji kodira transkripcijski čimbenik SRY. Ako je prisutan taj čimbenik, iz indiferentne gonade se razvije testis. U slučaju da nema SRY čimbenika, tj. Y kromosoma, razvije se jajnik. Osnovu gonada čini par uzdužnih spolnih nabora nastalih umnažanjem epitela celoma (sekundarna tjelesna šupljina kralježnjaka nastala iz mezoderma) i zgušnjavanjem mezenhima ispod njega. Spolni nabori se nalaze medijalno od mezonefrosa. Mezodermalni celomski epitel proliferira i stvara primitivne spolne tračke. Takva spolna žlijezda je indiferentna, tj. muška se ne razlikuje od ženske. U muškaraca pod utjecajem SRY gena iz primitivnih tračaka nastanu medularni spolni tračci te se razvije testis. U žena zbog manjka SRY gena nestaju spolni tračci u srži gonade te ih zamijeni stroma u meduli. Epitel proliferira i u 7. tjednu nastanu kortikalni tračci koji su smješteni u budućem korteksu jajnika. U 4. mjesecu se tračci dijele u odvojene stanice koje okružuju primitivne spolne stanice tvoreći primordijalne folikule (15).

U spolnim naborima nema spolnih stanica sve do 6. tjedna. U 3. tjednu trudnoće spolne prastanice se pojavljuju između endodermalnih stanica stijenke žumanjčane vreće od kuda kreću prema gonadama ameboidnim gibanjem. Dolaze krajem 5. tjedna do spolnih nabora gdje u 6. tjednu se smještaju u epitel. Spolne prastanice se diferenciraju u oogonije kada dospiju u spolnu žlijezdu koja je genetski ženska. Oogonije se započinju dijeliti mitozom u 12. tjednu te dosegnu svoj maksimalni broj u 20. tjednu. Zaustave se u profazi prve mejoze i diferenciraju se u primarne oocite. Takve primarne oocite budu okružene jednim tankim slojem spljoštenih pregranuloza stanica te čine primordijalne folikule (6, 15).

Sve do puberteta primarne oocite ostaju u profazi prve mejoze. Pregranuloza stanice luče OMI, mali peptid koji sprječava sazrijevanje oocita. OMI onemogućava nastavak mejoze. U pubertetu iz primordijalne pričuve se nadomještaju primarni folikuli. Svaki mjesec 15-20 folikula raste i napreduje kroz više stadija da bi naposljetku samo jedna oocita ovulirala dok ostali folikuli propadnu (15).

## 6.FOLIKULOGENEZA

U intrauterinom životu se postiže konačan broj folikula u jajnicima. Od tog trenutka nadalje folikuli se samo troše jer se više ne mogu obnavljati. Djevojčica se rađa s 2 milijuna folikula, a do menarhe se smanji broj na 300 000. Folikuli do menarhe ne mogu dozrijeti jer uz nisku razinu hormonskog poticaja bilježe početni rast, a zatim propadaju atrezijom. Atrezija je u najvećem broju slučajeva neovisna o gonadotropnim hormonima. Oko 50. godine potroši se većina folikula te nastaje menopauza kada jajnik proizvodi samo androgene hormone.



Slika 6. Sve faze folikulogeneze (16)

Folikulogeneza je proces razvoja folikula od primarnog do ovulacijskog tijekom kojeg većina folikula propadne atrezijom, a samo jedan ovulira. Traje 85 dana i ima dvije faze. Prva je faza toničkog rasta gdje kroz 70 dana preantralni folikuli rastu do malih antralnih folikula (2-4mm) neovisno o hormonima. Iako nisu ovisni o gonadotropinima, osjetljivi su na njih. Druga faza traje 15 dana u kojoj folikuli rastu

eksponencijalno. To je folikularna faza menstruacijskog ciklusa koja završi odabirom folikula i ovulacijom. Manje od 1% folikula od ukupnog broja u jajniku ovulira kroz život.

Tome prethodi rana folikulogeneza koja je autonomna, tj. neovisna o hormonima. U ovoj fazi je važna ponuda zdravih folikula za regrutaciju što ostvaruju autokrine-parakrine aktivnosti i estrogene mikrouvjete u jajniku. Inaktivni primordijalni folikuli čine pričuvu jajnika te određeni broj započinje početni porast neovisno o FSH-u. Većina završi atrezijom, a oni koji nastave rasti postaju preantralni folikuli (17). U preantralnemu stadiju folikula sploštene pregranuloza stanice postaju kubične i umnažaju se tako da nastaje višeslojni epitel granuloza stanica. S vanjske strane se nalazi ovojnica, theca folliculi, u čijem unutrašnjem sloju teka stanice postaju hormonski aktivne dok vanjski sloj čini vezivno tkivo (15). Ostvaruju se receptori za FSH na granuloza stanicama i receptori za LH i inzulin na teka stanicama. Granuloza stanice se umnožavaju, a folikuli rastu. Porastom razine FSH-a i E2-a, raste i broj RFSH-a na granuloza stanicama. Stanice granuloze stvaraju glikoproteinsku ovojnica, zonu pellucidu i tijesne spojeve za komunikaciju s oocitom. Nezreli ili mali folikuli imaju veću aktivnost  $5\alpha$ -reduktaze te proizvode DHT stvarajući androgeno mikroklime koja vodi manje folikule u atreziju. Proizvodnju androgena koči aktivin kojeg proizvode granuloza stanice.

Potrebno je 60 dana za razvoj antralnih folikula od ranih (0.2mm) do kasnih (2-15mm) stadija (17). Između granuloza stanica nastaju prostori ispunjeni tekućinom koji se spoje u šupljinu, tj. antrum folikula. Oocita je obavijena zonom pellucidom i smještena je ekscentrično u antrumu (15). Granuloza stanice se umnažaju 500 do 600 puta te se povećava proizvodnja E2-a, OMI-a, AMH-a, IGF-a, aktivina, inhibina B i folistatina u stanicama. U svakom jajniku se nalazi 5-15 antralnih folikula veličine 2-11mm što se naziva pričuva antralnih folikula, AFC. Pričuva antralnih folikula je proporcionalna razini AMH-a i u manjoj mjeri razini inhibina B. Iz te pričuve se svaki ciklus odabire 10 do 20 folikula (2-4mm) kada dođe do perimenstruacijskog porasta FSH-a. Važna je estrogena mikroklime u jajniku koju u početku omogućuje povišena proizvodnja aktivina iz granuloza stanica. Aktivin koči androgene iz teka stanica. Daljnjim razvojem folikula smanjuje se proizvodnja aktivina i raste proizvodnja inhibina B i IGF-a.

U sredini folikularne faze se odabire dominantni folikul između 5 do 6 preostalih antralnih folikula (7-8mm). Izabrani antralni folikul ima najviše RFSH-a, najveću aktivnost aromataze i najveću proizvodnju

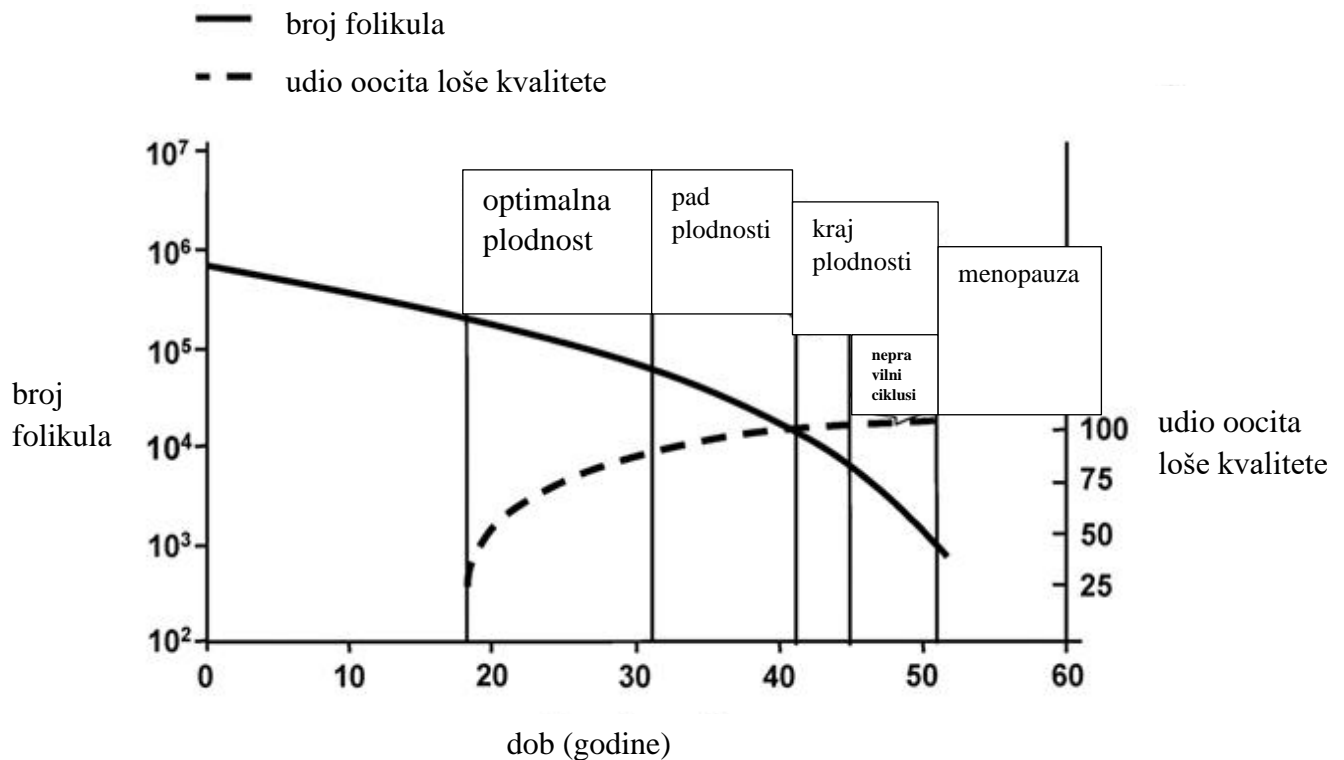
E2-a. On je najosjetljiviji na FSH. Ostali antralni folikuli imaju manju osjetljivost na FSH te im raste proizvodnja TNF- $\alpha$  što ih vodi u apoptozu. Inhibin B koji se najviše luči sredinom folikularne faze ciklusa selektivno smanji proizvodnju i izlučivanje FSH-a. Zato samo jedan folikul s najviše receptora za FSH održi osjetljivost na smanjenu razinu FSH-a. Također, u odabiru dominantnog folikula sudjeluje i AMH koji parakrino inhibira učinak FSH-a i tako umanjuje osjetljivost konkurentnih folikula na FSH. Oocita isto sudjeluje u odabiru dominantnog folikula. Preko tijesnih spojeva, tj. gap junctions komunicira s granulosa stanicama. Šalje biosignale GDF-9 i BMP-15 koji utječu na razvoj granulosa i teka stanica te na mobilizaciju teka stanica iz jajnične strome. Na samoj oociti se nalaze receptori za faktore rasta i citokine. U odabranom folikulu umnažaju se enzimi steroidogeneze te je visoka proizvodnja i koncentracija E2-a u folikulu i krvi. Desetog dana folikul doseže promjer od 15mm i postaje predovulacijski folikul (17).

Zadnji stadij je predovulacijski, tj. Graafov folikul u kojem je antrum ispunjen folikularnom tekućinom dok oocita okružena granulosa stanicama čini izbočinu, cumulus oophorus u antrumu (15). Predovulacijski folikul zadnja 4-5 dana folikularne faze ciklusa izrazito raste. U promjeru postigne 20-25mm. Ima 50 milijuna granulosa stanica. Poraste aktivnost aromataze 1000 puta što povećava proizvodnju E2-a i testosterona. Započne proizvodnju P4-a. Kada naraste razina E2-a iznad 150-250 pg/ml kroz 2-3 dana, ostvari se pozitivna povratna sprega. Poveća se pulsatilno lučenje GnRH-a što dovede do skoka FSH-a i LH-a 36 sati prije ovulacije. LH inhibira OMI i završi se prva mejoza oocite (17). Nastane sekundarna oocita koja dalje ulazi u drugu mejozu te se zaustavi u metafazi II tri sata prije ovulacije. Drugu mejozu će dovršiti samo ako dođe do oplodnje. U suprotnom oocita propada za 24h. Također, rezultat prve mejoze je uz sekundarnu oocitu i prva polocita koja sadrži samo tanki sloj citoplazme. Ona se isto podijeli (15). FSH potakne mucifikaciju cumulus oophorusa i odvajanje od baze. Porast P4-a povećava sintezu proteolitičkih enzima i prostaglandina što dovede do degradacije stijenke folikula (stigme) i izbacivanja sazrele oocite. Također, povećava se broj receptora za LH na granulosa stanicama što označi folikulo-luteinski prijelaz (17).



## 7. OVARIJSKO STARENJE

Ovarijsko starenje je postepeni proces smanjenja broja i kvalitete jajnih stanica što dovodi do prirodnog smanjenja plodnosti u reproduktivnom životu žene. Starenjem se smanjuje broj folikula te se povećava postotak kromosomskih abnormalnosti oocite (9).



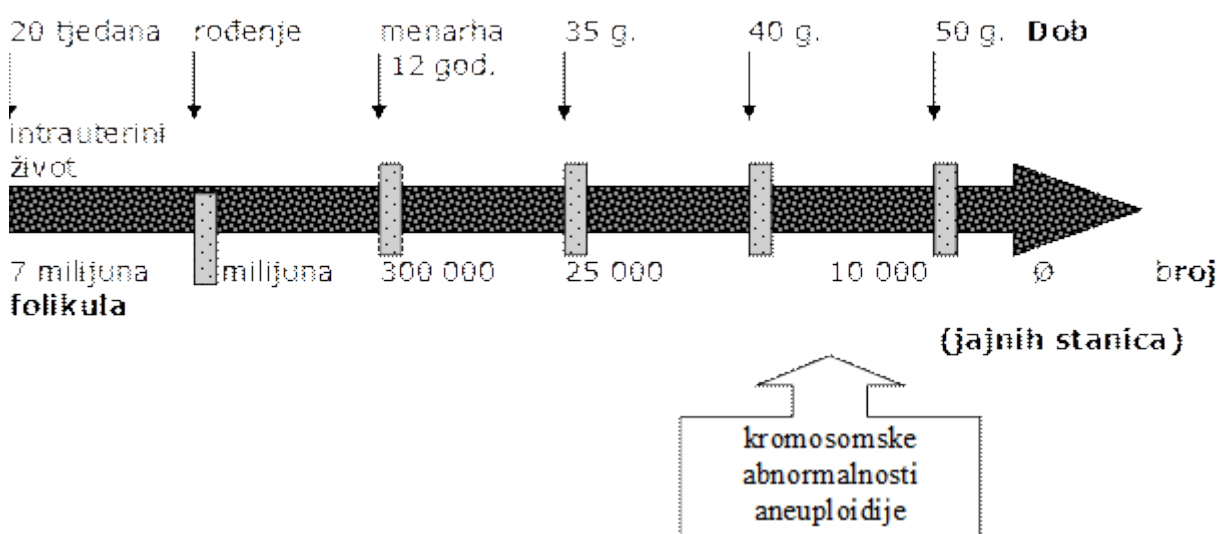
Slika 7. Prikaz broja folikula u jajnicima i kromosomalne kvalitete oocita ovisno o dobi žene i stadijima reproduktivnog života (9)

Graf prikazuje istovremeni pad broja folikula i povećanje udjela oocita slabe kvalitete. Smanjenje broja folikula započinje još prije rođenja dok smanjenje kvalitete u 20-tima. U 20-tima je plodnost najbolja, u 30-tima se smanjuje te u ranim 40-tima završava. Zanimljivo je kako u trenutku završetka plodnosti još uvijek postoji manji broj folikula (oko 10 000), ali su gotovo sve oocite kromosomski abnormalne. To ukazuje na veću važnost pada kvalitete nego broja jajnih stanica (9).

## 7.1 Smanjenje broja oocita

U četvrtom mjesecu intrauterinog života u fetalnim ovarijima se nalazi 6-7 milijuna oogonija. Tijekom druge polovice fetalnog razvoja događa se iznimno brzi pad broja oogonija i primarnih oocita zahvaljujući apoptozi te se djevojčice rađaju s 1-2 milijuna primordijalnih folikula. Nakon rođenja uspori se gubitak folikula te pred menarhu djevojke imaju 300 000 – 400 000 jajnih stanica (9). Tijekom života nema nove oogeneze, tj. za razliku od muškaraca žene se rađaju s konačnim brojem spolnih stanica (6).

U svakoj dobi žene najveći postotak folikula u jajniku čine primordijalni folikuli (>99%) (9). Primordijalni folikuli čine pričuvu koja miruje godinama te nadomještaju primarne folikule. Primarni folikuli napreduju kroz faze od preantralnih, antralnih do preovulacijskog folikula (18). Svaki mjesec odabere se dvadesetak malih antralnih folikula od kojih će samo jedan postati dominantni i ovulirati dok ostali prelaze u atreziju. Procjenjuje se da se utroši oko 650 folikula po mjesečnom ciklusu, tj. jednoj ovulaciji (1). Propale folikule nadomjesti vezivo i nastane corpus atreticum (15). Najčešće rani antralni folikuli prelaze u atreziju dok u preatralnom i preovulatornom stadiju mnogo rjeđe (19). Na kraju reproduktivnog života je više od 99.9% folikula prešlo u atreziju dok je samo 400-500 folikula ovuliralo (18).



Slika 8. Smanjenje folikula starenjem (20)

Kao što se vidi na ovoj vremenskoj crti, kroz život se neizbježno smanjuje broj folikula. S 35 godina pada broj folikula ispod 25 000, dok je u 40-tima preostalo još oko 10 000 (1). U 51. godini, u vrijeme posljednje menstruacije, je preostalo oko 1000 folikula u ovariju. Pad broja folikula rezultira prirodnom neplodnosti, nepravilnim menstrualnim ciklusima i menopauzom na kraju. Broj primordijalnih folikula u jajnicima perimenopauzalnih žena iznosi samo 1/10 folikula u jajnicima mladih žena s pravilnim ciklusima. U postmenopauzi više nema skoro niti jednog primordijalnog folikula u ovarijima (18).

Prije 2008. godine nije se mogao izračunati točan broj primordijalnih folikula te se broj procijenio iz četiri starije kombinirane studije. Smatralo se kako brzina smanjenja broja folikula ima dvofazični uzorak s izraženim ubrzanjem u 38. godini prema menopauzi. Danas zahvaljujući modernim stereološkim metodama može se točnije procijeniti broj primordijalnih folikula u ovarijima. Iako je ukupni zbroj folikula u određenoj dobi sličan starijim podacima, brzina smanjenja broja folikula je postepeno rastuća bez naglog ubrzanja u kasnim tridesetima. Pad fertiliteta je prema tome postupna pojava s godinama, a ne nagli događaj u kasnim tridesetima (9).

## **7.2 Smanjenje kvalitete oocita**

Usporedno s padom broja folikula, smanjuje se i njihova kvaliteta. Jedan od glavnih razloga smanjenja kvalitete je porast nerazdvajanja homolognih kromosoma ili sestrinskih kromatida u mejozi što se očituje učestalijom aneuploidijom zametaka u majka starijih od 35. godine. Uzroci tome mogu biti razlike u spolnim stanicama nastale u fetalno doba u ovarijima, nakupljena oštećenja u oocitama tokom života te promjene u kvaliteti granulosa stanica u folikulima koje nastaju s godinama (9).

Starenjem žene se smanji pričuva folikula te je probir za regrutiranje folikula svakog ciklusa sve teži. Oocite koje se regrutiraju su češće nedovoljne kvalitete s kromosomskim abnormalnostima ili aneuploidijom. Zbog općeg manjka folikula, takve nekompetentne oocite ovuliraju. Učestalost aneuplodnih oocita je u mladih žena između 20. i 25. godine samo 17-20%, dok starenjem raste i u žena između 35. i 39. godina iznosi 40-50%. Sa 45 godina su gotovo sve oocite aneuploidne (90-95%). Zbog aneuploidije zametka su češći spontani pobačaji jer zametak često nije spojiv sa životom. Upravo je to

razlog većem postotku spontanih pobačaja u kasnijim godinama. Žene nakon 30. godine imaju 10% rizik spontanog pobačaja. U drugoj polovici tridesetih rizik raste i do 15-20%. U 40-tima je najbrži porast gdje sa 40 godina 28% izgubi trudnoću, sa 42 godine 38%, sa 44 godine 45% te najviši je s navršениh 45 godina kada čak 65% žena izgubi trudnoću. Sukladno porastu aneuploidije, raste rizik kromosomskih abnormalnosti fetusa s godinama. U ranim dvadesetima je najniži rizik te jedna od 500 žena nosi plod s kromosomskim abnormalnostima. Nakon 35. godine jedna od 160-200 žena nosi kromosomski abnormalan plod. Isto kao i kod spontanih pobačaja, jako brzo se povećava broj s navršениh 40 godina. Sa 40 godina jedan od 65 fetusa ima kromosomsku grešku. Kroz sljedećih par godina izrazito se povećava učestalost kromosomskih greški te sa 45 godina svaki dvadeseti fetus je kromosomski abnormalan (1).

Tablica 1. Reprodukcijski rizici u različitim životnim dobima žene (21)

Dob žene / g.	Aneuploidne oocite	Spontani pobačaji	Rizik od kromosomskih abnormalnosti
20-25	17-20%	12%	1/500
30-34	20-28%	14%	1/300
35-39	40-50%	15-20%	1/160-200
40	60-70%	28%	1/65
42	70-80%	38%	1/40
44	80-90%	45%	1/25
≥ 45	90-95%	65%	1/20

Osim što je aneuploidija oocita jedan od glavnih uzroka povećanja neplodnosti sa starenjem, povisuje rizik spontanih pobačaja i smanjuje uspjeh medicinski potpomognute oplodnje. U mladih žena uspjeh jednog IVF ciklusa iznosi 30-45% dok u 40-godišnjakinja iznosi samo 12-13%. Sa 45 godina se smanji na samo 1,5 – 2,5% uspjeha te zbog toga se u tim godinama preporuča korištenje doniranih oocita (1).

### 7.2.1 Aneuploidija oocita

Aneuploidija je promjena u broju strukturno nepromijenjenih kromosoma gdje broj kromosoma može biti manji za jedan (monosomija), prekobrojan za jedan (trisomija) ili za više njih (polisomija) (22). Mnogobrojna istraživanja su dokazala kako je jedan od najčešćih uzroka trisomija i monosomija nerazdvajanje kromosoma tokom prve ili druge mejoze u jajnim stanicama. Kromosomske abnormalnosti su mnogo češće u ženskim nego muškim spolnim stanicama te su eksponencijalno učestalije sa starenjem žena (9).

U najvećem broju slučajeva aneuploidija fetusa završi spontanim pobačajem. U nekim slučajevima mogući je porođaj te je danas aneuploidija najčešći uzrok mentalne retardacije. Najčešće aneuploidije s kojima se djeca rađaju su trisomija 21 i trisomije spolnih kromosoma koje su spojive sa životom te se pojavljuju u 0,3% novorođenčadi i 4% mrtvorodenčadi. U klinički prepoznatim pobačajima između 6. i 20. tjedna gestacije, aneuploidije su mnogo učestalije i iznose 35%. Uglavnom se radi o trisomijama i monosomijama različitih kromosoma. Najveći je postotak aneuploidija u rano izgubljenim trudnoćama gdje iznose čak do 65-75%. Procjenjuje se kako je 5% svih začeca aneuploidno. Ovakva procjena ne uključuje podatke okultnih trudnoća, embrija prije implantacije te oocita. Zbog toga se smatra da je prava učestalost mnogo veća.

Jedini čimbenik koji je neosporno povezan s aneuploidijom je dob majke. Još 1933. godine je prepoznata povezanost majčine dobi i pojave Downovog sindroma. Kasnije su povezane i druge trisomije s majčinom dobi. Učestalost trisomija u klinički prepoznatim trudnoćama iznosi 2% u žena mlađih od 25 godina dok u žena starijih od 40 godina čak 35%. Starija dob majke nosi veći rizik nerazdvajanja kromosoma i posljedične aneuploidije. Rasa, socioekonomski status ili geografska raznolikost ne utječu na pojavnost aneuploidije. Mnogi drugi okolišni ili genetski čimbenici rizika su bili predloženi, ali niti jedan nije dokazan.

Podrijetlo različitih aneuploidija je bilo razjašnjeno proučavanjem DNA polimorfizma. Za monosomiju 45,X u 70-80% slučajeva nedostaje očevo X ili Y. S druge strane, većina trisomija nastaju zbog greške u

mejozi I u oocitama. Razlog bi mogao biti što je prva mejoza započeta intrauterino, a završena godinama kasnije u vrijeme ovulacije (3).

### **7.2.2 Mejotičke greške**

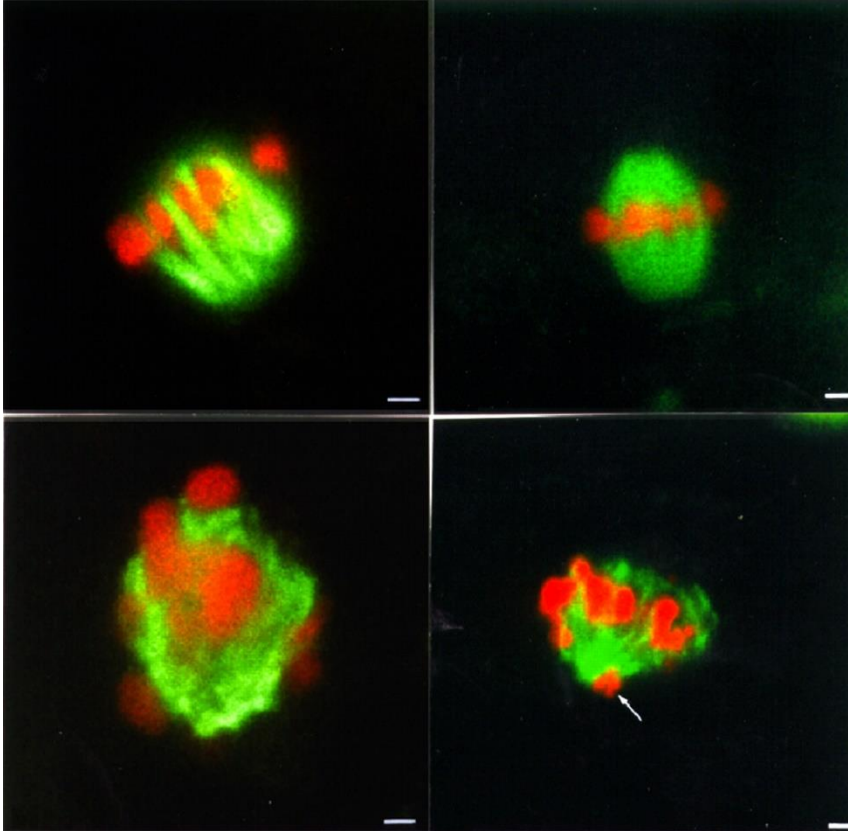
U fetalno doba oogonije započinju prvu mejotičku diobu. U profazi između homolognih kromosoma se rekombinira genetski materijal. U metafazi koja slijedi se zaustavlja mejoza. U tom obliku oocite miruju godinama dok ne budu izabrane za ovulaciju što može biti i za 45 godina. Na kraju folikulogeneze u jedinom preostalom predovulacijskom folikulu završi se prva mejoza. Sekundarna oocita tada uđe u drugu mejozu, no bude zaustavljena također u metafazi. Drugu diobu završi samo u slučaju oplodnje (9).

Prva mejotička dioba odvaja homologne kromosome nakon rekombinacije genetičkog materijala koja je svojstvena profazi I. Tijekom mejoze I može doći do nepravilne segregacije homolognih kromosoma. Potpuno nerazdvajanje podrazumijeva kako oba para homolognih kromosoma putuju skupa na isti pol stanice. Nastaju dvije nove stanice od kojih je jedna diploidna, a u drugoj nema kromosoma. Ako se homologni kromosomi ne povežu i ne rekombiniraju, odvojeno putuju na isti pol stanice što se naziva ahijzmatično nerazdvajanje. Ovdje također je jedna stanica kćer diploidna, a druga bez kromosoma. Moguće je i prerano razdvajanje sestrinskih kromatida jednog homolognog para gdje svaka kromatida odlazi na drugi pol stanice. U drugoj mejotičkoj diobi odvajaju se sestrinske kromatide te je mejoza II nalik mitozu. Nastaju četiri haploidne gamete. Nerazdvajanje u mejozi II nastaje zbog nemogućnosti segregacije kromatida. Ovakve greške nerazdvajanja kromosoma su češće u starijih žena čije su oocite dulji niz godina provele u mirovanju. Citogenetikom je otkriveno kako nerazdvajanje kromosoma i prerano razdvajanje kromatida u oocitama je uzrok 2/3 slučajeva aneuploidija (3).

### **7.2.3 Diobeno vreteno**

Diobeno vreteno su nužna za razdvajanje kromosoma u mitozu i mejozi te za održavanje stabilnosti genoma nakon dijeljenja stanica. Vreteno su dinamičke strukture koja su izgrađena od snopa mikrotubula. Poremećaji u funkciji vretena u oocitama će uzrokovati greške u segregaciji kromosoma. Specifični regulatorni mehanizam ili kontrolne točke upravljaju ispravnim razdvajanjem kromosoma.

Mejoza se nastavlja samo kada su svi kromosomi ispravno poredani u ekvatorskoj ravnini. Zbog neučinkovitog rada, kontrolne točke u starijih žena dopuštaju progresiju mejoze unatoč tome što se kromosomi nisu ispravno poredali u metafaznoj ploči (3).



Slika 10. Diobena vretena u mejozi u dvije skupine žena, 20-25 i 40-45 godina (9)

Na slici se vide mejotička vretena (crveno) i kromosomi (zeleno) u oocitama. Gornje slike pokazuju oocite u metafazi II kod žena između 20. i 25. godine gdje su homogeni mikrotubuli u diobenom vretenu te je pravilna raspodjela kromosoma po metafaznoj ploči. U starijih žena između 40. i 45. godine dezorganizirani su mikrotubuli vretena te većina kromosoma nije pravilno poredana ili je dislocirana od metafazne ploče. Ove slike potvrđuju kako se sa starenjem mijenja diobeno vreteno i poravnavanje kromosoma tokom metafaze (9).

Najčešći su defekti u starijih oocita vezani uz diobeno vreteno (skraćivanje ili disorganizacija) i poravnavanje kromosoma u ekvatorskoj ravnini. Oboje dovode do nepravilnog razdvajanja kromosoma tijekom mejoze. Posljedično je učestalija aneuploidija oocita sa starenjem (3).

#### **7.2.4 Kohezini**

Na nerazdvajanje kromosoma utječe disfunkcija kohezina. Kohezini su proteinski kompleksi koji održavaju povezanost sestrinskih kromatida i homolognih kromosoma. Cijepanje kohezina je nužno za pravilnu segregaciju kromosoma u mejozi. U starijih žena oocite koje nastavljaju mejozu su starije te su sve češće greške u kohezinima i segregaciji tijekom mejoze (19). Također, slabljenje povezanosti kromosoma, tj. kromatida se češće javlja u jajnim stanicama u kojima je bila narušena funkcija vretena ili kontrolnih točaka staničnog ciklusa tijekom oogeneze (3).

Angell je proveo istraživanje o povećanoj učestalosti aneuploidije u žena te je uzrok tome našao u preranom razdvajanju kromatida tijekom mejoze. S godinama se postepeno smanjuje razina kohezina što dovodi do preranog razdvajanja sestrinskih kromatida u mejozi I (18).

#### **7.2.5 Centromere**

Mjesto rekombinacije između nesestrinskih kromatida u profazi I može povećati rizik nerazdvajanja kromosoma. Izmjene genetičkog materijala koje su preblizu ili predaleko od centromera imaju veći rizik nerazdvajanja. U istraživanju trisomija pomoću genetičkog mapiranja, uspoređivana je učestalost i distribucija rekombinacija u mejozama koje bi završile trisomijom i mejozama s ispravnim brojem kromosoma. Zaključili su kako je značajna redukcija u rekombinaciji u svim trisomijama koje nastaju tijekom prve mejoze. Objasnjeno je s ahijzmatičnim razdvajanjem gdje se kromosomi ne uspiju rekombinirati ili su minimalne promjene kromosoma. Iako su pronađene rekombinacijske greške u mejozi II, one su mnogo rjeđe nego u mejozi I (3).

#### **7.2.6 Telomere**

Telomere su ponavljajuće DNA sekvence na krajevima kromosoma koje štite integritet i stabilnost kromosoma. Sa svakom staničnom diobom se skraćuju. Duljina telomera je pokazatelj staničnog starenja. Jednom kada telomere dosegnu krajnju duljinu, stanični ciklus se zaustavlja te stanica odlazi u apoptozu. Telomerase su enzimi koje održavaju duljinu telomera i osiguravaju genomsku stabilnost (23). Aktivnost telomeraza je prisutna u mladim ovarijima, ali se smanjuje s godinama. Novija istraživanja smatraju kako je manjak primordijalnih folikula u pričuvi povezan sa smanjenjem aktivnosti



telomeraza te navode duljinu telomera kao mogući marker ovarijskog starenja. U svakom slučaju starije oocite zbog smanjene aktivnosti telomeraza ne mogu održati integritet kromosoma (18). Skraćenje telomera na krajevima kromosoma te posljedične greške DNA i kromosoma su evolucijski mehanizam sprječavanja starijih žena da nose rizične trudnoće koje bi ugrozile njihovo vlastito zdravlje (19).

### **7.2.7 Mitochondriji**

Oocite su najveće stanice u tijelu i zahtijevaju dovoljno energije za procese transkripcije i translacije tijekom sazrijevanja. Nedostatak ATP-a može ireverzibilno oštetiti kvalitetu oocite. Mitochondriji su glavni proizvođači energije. Manjkavost mitochondrija može kompromitirati procese kojima je potrebna energija poput formiranja diobenog vretena, poravnavanja kromosoma ili rada kontrolnih točaka što vodi aneuploidiji.

Oocite tijekom sazrijevanja koriste piruvat kao glavni izvor energije te ih dodatno granuloza stanice kroz tijesne spojeve opskrbljuju s ATP-om i drugim nutrijentima. Ako su mitochondriji oštećeni u granuloza stanicama, mogu naštetiti kvaliteti oocite jer je smanjeno opskrbljuju s ATP-om.

U žena s 38 godina nađeno je više defektnih mitochondrija nego u mlađi žena. Niski membranski potencijal u oštećenim mitochondrijima jajnih stanica ima učinak na formiranje diobenog vretena i povezan je s kromosomskim nerazdvajanjem. Nakon završetka mejoze oocite postaju transkripcijski inaktivne te im je ATP potreban samo za bazalni metabolizam i formiranje vretena. Postoji uska povezanost mitochondrija i integriteta mreže mikrotubula. Mitochondriji imaju ključnu ulogu u kontroliranju unutarstaničnog pH tako što se grupiraju oko vretena, uvjetuju funkciju proteina i citoskeletnu organizaciju te reguliraju unutarstaničnu homeostazu kalcija. Zajedno s endoplazmatskim retikulumom prenose oscilacije razine kalcija koje imaju važnu ulogu u aktivaciji oocite. Također, moduliraju kalcij/kalmodulin-ovisnu protein kinazu II koja omogućava prijelaz oocite iz metafaze I u anafazu I. Oštećenje mitochondrija u starijim oocitama izravno utječe na formiranje vretena zbog smanjene opskrbe energijom i neizravno kompromitiranjem mitochondrijskog clusteringa oko vretena. Rezultat toga je veći rizik nerazdvajanja kromosoma (3). Također, dolazi do promjene mitochondrijske DNA sa starenjem koja postaje nestabilnija. Mogući je i prijenos abnormalnosti mtDNA s majke na

embrij (19). Provedeno je istraživanje u kojem su bile uspoređene mlade i stare oocite te je dokazano kako je u starijima drugačija ekspresija mitohondrijskih gena koji sudjeluju u metabolizmu ATP-a i ubikvitin-proteasoma koji selektivno uništava proteine stanice. U starijim mitohondrijima oscilacije koncentracija kalcija nisu uspjele aktivirati proizvodnju ATP-a koji je potreban za formiranje vretena, poravnavanje kromosoma i održavanje fizioloških procesa stanice. U drugom istraživanju su ugasili gen *polgA* u miševa što je prouzročilo defekt mtDNA polimeraze koja je potrebna za replikaciju i popravak mtDNA. Ti miševi su zbog nakupljenih mutacija mitohondrijske DNA prijevremeno ostarjeli. To je potvrdilo uzročnu povezanost mutacija mtDNA i starenja u sisavaca (18).

### **7.2.8 Granuloza stanice**

U žena u kasnim tridesetima je smanjeni broj granuloza stanica te posljedično proizvode manje steroidnih hormona i glikoproteina. Imaju više oštećenja mitohondrija te delecija mtDNA u granuloza stanicama što povećava rizik aneuploidije i oštećenja oocite. Granuloza stanice u starijih žena imaju smanjenu ekspresiju antioksidacijskih enzima što pridonosi oksidacijskom stresu stanica, ali i oocite (19).

## 8. UZROCI OVARIJSKOG STARENJA

### 8.1 Genetički čimbenici

Uspoređivanjem između sestara te majka i kćeri, pronađena je sličnost u godinama kada nastupa menopauza. To upućuje na ulogu gena u reproduktivnom starenju. Nasljednost se procjenjuje između 30% i 85%.

Prijevremeno ovarijsko starenje je poremećaj jajnika u kojem se iscrpi pričuva primordijalnih folikula prije 40.godine. Taj poremećaj je poslužio kao model za istraživanje genetskog učinka na starenje jajnika. U pacijentica s POF je pronađeno više gena (GDF9, BMP15, FOXL2) s mikrolecijama koje prouzrokuju preuranjeno starenje jajnika (18). Ti geni su faktori koji potiču regrutiranje folikula iz pričuve primordijalni folikula. Njihove mutacije uzrokuju prebrzi gubitak folikula.

Osim tih gena, proučavani su i drugi geni za koje se smatra kako imaju ulogu u ovarijskom starenju poput onih koji sudjeluju u razvoju fetalnog jajnika, sazrijevanju primordijalnih folikula, apoptozi folikula i vaskularizaciji jajnika. Za sve promatrane gene se uspoređuju kvantitativne i kvalitativne razlike poput SNP-a ili CNV-a koje bi mogle utjecati na dob ovarijskog starenja. SNP je jednonukleotidni polimorfizam kada je jedan nukleotid zamijenjen drugim na određenom genskom lokusu. CNV je varijacija u broju kopija lokusa. Razlike u SNP-u ili CNV-u određenih gena mogu utjecati na fenotip, tj. reproduktivno starenje.

Mapiranje genoma određenih populacija je omogućilo proučavanje polimorfizma u genima povezanim s ovarijskim starenjem. Polimorfizam enzima CYP1B1-4 je povezan s mladošću u kojoj se javlja menopauza. Taj enzim je dio citokrom P450 obitelji enzima. Kod ovog polimorfizma se javlja povišena razina estrogena tijekom reproduktivnog života. Još uvijek nije otkriveno kojim točno mehanizmom ubrzava menopauzu. U drugim studijama je pronađena povezanost polimorfizma estrogenskih receptora i početka menopauze. Žene koje su bile homozigoti mutiranog alela su 1,1 godinu kasnije ulazile u menopauzu. U više studija s velikom kohortom žena u menopauzi je povezan polimorfizam gena AMH receptora 2 s menopauzalnom dobi. Žene s tim polimorfizmom imaju slabiji učinak AMH-a, tj. smanjena je inhibicija regrutiranja primarnih folikula. Radi toga se brže folikuli mobiliziraju iz pričuve i ovariji

se ranije iscrpe. Zbog uloge FSH receptora na odgovor ovarija kod egzogene stimulacije u procesu IVF-a gdje su različite varijante receptora uvjetovale odgovor ovarija, smatralo se kako bi RFSH-i mogli imati važnu ulogu u reproduktivnom starenju. Ipak, istraživanja nisu pronašla značajni učinak polimorfizma RFSH-a na dob kada započinje menopauza.

Drugi pristup proučavanja gena uključenih u ovarijsko starenje je skeniranje genoma u potrazi za poveznicom. Skenirani su genomi sestra gdje je pronađena sličnost u 2 regije - Xp21.3 i 9q21.3. Uključenost X kromosoma je bila očekivana jer je poznata njegova uloga u prijevremenom ovarijskom starenju (9). Na X kromosomu nalazi se FMR1 gen čije dinamične mutacije uzrokuju produljenje broja tripleta CGG u nekodirajućoj regiji gena. Kada je broj tripleta veći od 200, nastaje Fragilni X sindrom koji uzrokuje mentalnu retardaciju. Ako je broj tripleta u sivoj zoni (između 55 i 200), ne razvija se klinička slika sindroma. Žene koje su nositeljice premutiranih gena imaju veću učestalost prijevremenog zatajenja ovarija, kraće trajanje menstruacijskih ciklusa, povišeni FSH i snižene razine inhibina A i B (24). Na kromosomu 9 u navedenoj regiji je bio značajan pronalazak gena iz obitelji BCL2 koji je odgovoran za apoptozu. Na isti način je skeniranjem genoma pronađen jednonukleotidni polimorfizam na kromosomima 5, 6, 13, 19 i 20 koji pridonose određivanju ranog ili kasnog početka menopauze (9).

## **8.2. Mikrokolišni čimbenici**

### **8.2.1 Oksidativni stres**

Oksidativni stres se smatra jednim od glavnih krivaca starenja. Tijekom svakodnevnih metaboličkih procesa u stanici se stvaraju visoko reaktivni kisikovi i dušikovi slobodni radikali. Starenjem dolazi do smanjenja staničnog disanja što povećava istjecanje elektrona unutar mitohondrija i povećano je stvaranje slobodnih kisikovih radikala. Kisikovi radikali utječu na stabilnost mtDNA i rad mitohondrija. Oksidativni stres nastane kada oksidansi nadmaše kapacitete antioksidansa. Oksidativna oštećenja mogu potaknuti oslobađanje citokroma c i drugih okidača apoptoze iz mitohondrija što rezultira staničnom smrću. Starenjem se povećava stvaranje slobodnih kisikovih radikala koji oksidiraju stanične proteine. Razina slobodne skupine –SH na proteinima koristi se za dokazivanje povezanosti unutarstaničnog oksidativnog stresa i ovarijskog starenja. Zbog oksidacije –SH skupine na staničnim proteinima, snizi

se razina slobodne skupine –SH. Pronađeno je značajno smanjenje slobodne –SH skupine proteina u ovarijskoj folikularnoj tekućini u starijih žena. Pad slobodne –SH skupine upućuje na povećani oksidativni stres u jajnicima u žena starije reproduktivne dobi. U drugom istraživanju je pronađena poveznica smanjenog uspjeha IVF-a s višim razinama kisikovih radikala. Zaključeno je kako u folikularnoj tekućini starijih žena su više razine slobodnih radikala nastalih oksidativnim stresom.

Starenjem dolazi do smanjenja ili oštećenja antioksidirajućeg enzimskog sustava obrane od slobodnih radikala. U jajnim stanicama koje su ovulirale u starijih miševa je pronađen manjak važnog antioksidansa, glutationa i enzima glutation transferaze (Taurin). Slično je u oocitama starijih žena pronađen smanjeni omjer katalaza i superoksid dismutaza što ukazuje na smanjenu sposobnost obrane od oksidansa. Slabljenje antioksidirajućeg učinka je vidljivo i u granulosa stanicama gdje je smanjeni broj Cu/Zn superoksid dismutaze, Mn superoksid dismutaze i katalaze. Oksidativna oštećenja koja se nakupljaju s godinama smanjuju kvalitetu oocita i dovode do ovarijskog starenja. U istraživanju provedenom sa starijim ženama na IVF-u je pronađena značajno viša razina 8-OHdG, markera oksidacijskog stupnja DNA te proporcionalno viši udio degenerativnih oocita. Nadalje, u žena koje nisu uspjele zatrudnjeti nakon IVF-a je dan antioksidans što je snizilo razine 8-OHdG u folikulima i povisilo stopu trudnoće. Ovi rezultati upućuju kako oksidativni stres ima negativni učinak na razvoj oocita te smanjuje njihovu kvalitetu s godinama (18).

### **8.2.2 AGE proizvodi**

AGE proizvodi ili krajnji produkti glikacije nastaju nepovratnim procesom tijekom starenja. Krajnji produkti glikacije se vežu za posebne receptore na različitim stanicama kao npr. na endotelu i glatkim mišićnim stanicama što potakne oksidativni stres u tim stanicama. Na primjer, u Alzheimerovoj bolesti AGE depoziti u stijenkama arterija potiču oksidativni stres. Osim toga, krajnji produkti glikacije potiču nepovratno križno povezivanje proteina i njihovo oštećivanje. Ubrzavaju aterosklerozu križnim povezivanjem kolagena u stijenkama krvnih žila. U istraživanjima koristili su različite inhibitore stvaranja AGE-a u pokusnim životinjama što je spriječilo ili usporilo starenje. Time je potvrđena povezanost krajnjih produkata glikacije sa starenjem. U drugom istraživanju su uspoređivani prekursori AGE-a u ovarijima starih i mladih miševa. U ovarijima starijih miševa je pronađena niža aktivnost

enzima koji uništava metilglioksal, jedan od glavnih prekursora AGE-a. Nakupljanje krajnjih produkata glikacije u ovarijskom starenju može prouzročiti aktivaciju oksidativnog stresa u stanicama preko receptora za AGE i smanjenju vaskularizaciju folikula (18).

### **8.2.3 Vaskularizacija**

Za razvoj folikula i kvalitetu oocite je nužna periferna vaskularizacija koja opskrbljuje kisikom, hranjivim tvarima i parakrinim regulatorima. Primordijalni i preantralni folikuli su opskrbljeni preko krvnih žila strome jajnika, a antralni folikuli ovise o kapilarama koje su urasle u teku. Upravo dominantni folikul ima više kapilara od drugih rastućih folikula. Oocite koje su dobro opskrbljene kisikom imaju bolji potencijal za razvoj i ovulaciju. Nedovoljnim brojem kapilara u teki folikula starijih žena nastaje hipoksija folikula te oksidativni stres. U mitohondrijima granuloza stanica takvih folikula nađena su oštećenja nastala hipoksijom. Ako se usporede oocite mlađih žena čiji su folikuli imali ugroženu perifernu vaskularizaciju i oocite starijih žena, pronađu se slična hipoksijska oštećenja vretena i kromosoma. Zbog oslabljenje periferne prokrvljenosti, u ovarijima je manjak kisika, hranjivih tvari i signalnih molekula što smanjuje kvalitetu oocita i vodi ovarijskom starenju (18).

### **8.3 Patološki čimbenici**

Bolesti ovarija mogu pridonijeti smanjenju plodnosti. Jedna od najčešćih bolesti reproduktivnih žena je endometrijoza. Učestalost endometrijoze je povezana s godinama i najviše je oboljelih u dobi između 40. i 44. godine. Endometrijoza utječe na neplodnost jer je čak 30-50% oboljelih neplodno. Laparoskopskom ekscizijom ili ablacijom lezija u blagih ili srednje teških slučajeva može se riješiti neplodnost i povećati uspjeh začeca (18).

### **8.4 Okolišni čimbenici**

Različite studije su proučavale utjecaj okolišnih faktora poput pušenja, alkohola, oralnih kontraceptiva i povišenog BMI-a na ovarije i reproduktivno starenje (19).

Duhan je epigenetski pokretač promjena na jajnim stanicama koje dovode do smanjenja ovarijske rezerve. U dimu cigareta nalazi se par tisuća toksičnih komponenta koje utječu na folikulogenezu,

steroidogenezu, embriotransport, receptivnost endometrija, miometrija i uterinu opskrbu krvi. Potiče oksidativni stres, staničnu apoptozu, abnormalnu komunikaciju granulosa stanica i oocite te oštećuje proces mejoze. Tim mehanizmima usporava i zaustavlja rast i razvoj folikula (10). Pronađena je razlika u gustoći folikula u ovarijima premenopauzalnih žena između onih koje nikada nisu pušile i onih koje su bivši ili sadašnji pušači. Žene koje su pušile imale su manju gustoću folikula u korteksu jajnika. Isto su pronašli i u žena koje nikad nisu pile alkohol i one koje su ga konzumirale gdje su manje folikula imale žene koje su pile alkohol (19).

Poznato je kako je ovarijsko starenje povezano s izloženošću teškim metalima, pesticidima, kemikalijama te zračenju koji mogu smanjiti broj oocita uništavajući folikule te naštetiti procesu mejoze i uzrokovati aneuploidiju (18).

## 9. STARENJE I REPRODUKCIJSKA ENDOKRINOLOGIJA

Početak puberteta započinje pulsatilno lučenje GnRH-a iz hipotalamusa. Djevojčice u tom periodu ubrzano rastu i nakupljaju dovoljno masnog tkiva. Masno tkivo luči hormone uključujući i leptin koji signalizira hipotalamusu o ostvarenoj rezervi energije. Iz nucleus arcuatusa započinje skokovito lučenje GnRH-a koji potiče adenohipofizu na lučenje gonadotropina, LH-a i FSH-a.

Glavna uloga FSH-a je poticanje rasta i sazrijevanja folikula. FSH stimulira rast 15-20 malih antralnih folikula svaki mjesec u jajniku. FSH ne potiče razvoj primordijalnih folikula u primarne. Također, potiče sazrijevanje granulosa stanica te steroidogenezu. Estradiol se proizvodi u granulosa stanicama u folikulima i žutom tijelu iz androgena pod utjecajem FSH-a. U jajniku povećava broj RFSH-a i E2R-a te stvaranje antruma i tijesnih spojeva u folikulima. E2 također potiče sazrijevanje folikula. Kontrolira ciklus negativnom, ali i pozitivnom povratnom spregom. Estrogen ima učinak negativne povratne sprege na oslobađanje FSH-a i LH-a. Smanjuje osjetljivost stanica hipofize na GnRH te potiče oslobađanje dopamina i  $\beta$ -endorfina koji su inhibitori GnRH-a. Samo estradiol u visokoj koncentraciji ima mehanizam pozitivne povratne sprege kada stimulira oslobađanje gonadotropina. To se događa u vrijeme prije ovulacije kada je estradiol  $> 200\text{pg/m}$  kroz 46 do 50 h i dovede do predovulacijskog skoka LH-a i FSH-a. Mijenja gustoću cervikalne sluzi kako bi postala prohodna za spermije i potiče proliferaciju endometrija (17).

Pod LH utjecajem na kraju folikularne faze predovulacijski folikul se povećava u promjeru do 25mm te primarna oocita završi prvu mejozu i bude zaustavljena u metafazi druge. U sredini ciklusa nastane naglo povišenje LH-a koji potakne sazrijevanje primarne oocite u sekundarnu, pucanje folikula i izbacivanje oocite te luteinizaciju preostalih granulosa stanica. Granuloza i teka interna stanice hipertrofiraju i odlažu se lipidi u njima te nastaje žuto tijelo, corpus luteum (15). Progesteron se proizvodi u granulosa stanicama predovulacijskog folikula i u žutom tijelu pod kontrolom LH-a. U ovariju smanjuje broj P4R-a i E2R-a te smanjuje aktivnost aromataze. Kontrolira ciklus sinergistički s E2-om. Progesteron pojačava supresijski učinak estradiola. U fazi žutog tijela zajedno snižavaju lučenje FSH-a i LH-a kako bi onemogućili rast pričuvnih folikula. Progesteron sam inhibira predovulacijski skok LH-a. Povećava gustoću cervikalne sluzi i potiče sekreciju i decidualizaciju endometrija. Priprema endometrij za



implantaciju. Ako nema trudnoće, zbog pada P4-a dolazi do ljuštenja endometrija i menstruacijskog krvarenja te započinje novi ciklus. U jajniku se još proizvode i androgeni, tj. androstendion i testosteron pod utjecajem LH-a u teka stanicama. Oni služe kao prekursori za estrogene. Androgeni inhibiraju aromatazu i inaktiviraju ER-e. Promiču atreziju folikula u androgenoj mikroklimi. Inhibiraju ovulaciju i oplodnju (17).

Osim steroidnih hormona, jajnik proizvodi i peptidne hormone. U granulosa stanicama poticajem FSH-a se proizvode peptidni hormoni jajnika koji imaju ulogu intraovarijskog modulacijskog sustava. Oni se izlučuju u folikularnu tekućinu i lokalno u jajniku gdje imaju autokrino-parakrino djelovanje. Također, mogu se izlučivati u cirkulaciju i imati sistemski učinak. Aktivin potiče izlučivanje FSH-a. Najviši je na početku folikularne faze ciklusa kada potiče početni rast folikula. Inhibin B je najviši u sredini folikularne faze ciklusa kada pomaže u izboru dominantnog folikula. Sprječava u hipofizi stvaranje i oslobađanje FSH-a. Također, autokrino inhibira aktivin i parakrino potiče proizvodnju androgena. Biljeg je pričuve jajnika jer je odraz funkcije manjih folikula. Inhibin A isto smanjuje razinu FSH-a, ali u luteinskoj fazi. Folistatin inhibira aktivnost FSH-a i aktivina te pojačava aktivnost inhibina. AMH djeluje parakrino inhibirajući učinak FSH-a. Najviše se proizvodi u preantralnim i malim antralnim folikulima (2-8mm). Sudjeluje u početnoj regrutaciji folikula, odabiru pričuve antralnih folikula u folikularnoj fazi ciklusa te u izboru dominantnog folikula. U odličnoj je korelaciji s AFC-om. Stabilna mu je proizvodnja, neovisno o endogenim ili egzogenim uvjetima. Zbog toga je danas najpouzdaniji marker pričuve antralnih folikula te upućuje na starenje jajnika i blizinu menopauze (17).

### **9.1. Izmijenjena pravilnost ciklusa**

Menstruacijski ciklus traje u prosjeku 28 dana s manjim odstupanjima (9). Trajanje menstruacijskog ciklusa kroz život je uglavnom stalno sve do par godina prije menopauze kada se pojavljuje skraćenje ciklusa zbog kraćeg trajanja folikularne faze. To je rani znak smanjene pričuve folikula. U kasnijoj fazi se javlja produljenje trajanja ciklusa zbog smanjene raspoloživosti antralnih folikula za selekciju dominantnog folikula (3). Trajanje menstruacijskog ciklusa se znatno razlikuje u svake žene od mjeseca do mjeseca. Cijeli ciklusi su preskočeni i amenoreje traju 60 ili više dana radi nedostatka antralnih

folikula. Naposljetku nastupi menopauza, posljednja menstruacija u životu, iza koje slijedi 12 mjeseci amenoreje. To označava kraj ovarijske aktivnosti i plodnosti (9).

## **9.2 Neuroendokrinološke promjene**

Prvi znak reproduktivnog starenja u žena s urednim ciklusima je povišena razina FSH-a. S daljnjim starenjem polagano padaju razine LH-a i FSH-a kroz godine te se smanjuje amplituda i frekvencija LH-a skokova, ali bez promjena u koncentraciji steroidnih hormona ovarija. Ovo je sugeriralo kako razlog leži u funkcionalnim promjenama hipotalamusa i hipofize neovisno o estrogenskoj i progesteronskoj povratnoj sprezi. Ipak, poznato je kako funkcionalne promjene hipotalamo-pituitarne jedinice se odvijaju tek u kasnim fazama reproduktivnog starenja. Stoga se zaključuje kako je uzrok promijenjenom odgovoru hipotalamusa i hipofize promijenjeni ovarijski feedback (9).

## **9.3 Promijenjeni ovarijski feedback**

Smanjeni broj antralnih folikula je glavni razlog promijenjenog ovarijskog feedbacka (9). Glavni uzrok povišenju FSH-a su snižene razine inhibina B i AMH-a. Njihova uloga je snižavanje razine FSH-a te ih luče preantralni i mali antralni folikuli. Smanjenjem broja tih folikula, snižuju se i razine inhibina B i AMH-a što u konačnici vodi povišenju FSH-a (18). U kasnijoj fazi menopauzalne tranzicije se smanjuju koncentracije estradiola i inhibina A što dodatno pripomaže gubitku negativne povratne sprege hipotalamusa i hipofize (19).

Zanimljivo, lučenje hormona u lutealnoj fazi ciklusa ne mijenja se nužno sa starenjem. U slučaju ovulacije nema promjena u sintezi i izlučivanju E2, P4 i inhibina A u žutom tijelu između mlađih i starijih žena. Defekti lutealne faze javljaju se tek u kasnoj fazi menopauzalne tranzicije kada su već ciklusi izraženo nepravilni. Promijenjeni corpus luteum može imati učinak na kvalitetu sekrecijskog endometrija ili na povišenje FSH-a tijekom luteo-folikularne tranzicije.

Par radova je pokazalo postepeni pad koncentracije androgena tokom reproduktivnog starenja. Ipak, nije dokazano u kojoj mjeri su ovariji zaslužni za to. Veća je vjerojatnost da su nadbubrežne žlijezde primarni uzrok ove promjene (9).

#### **9.4. Utjecaj monotropnog porasta FSH**

Povišenje koncentracije FSH-a ima više učinaka na ovarije. Ubrzava selekciju i rast dominantnog folikula što se očituje skraćenom folikularnom fazom te ukupno kraćim trajanjem ciklusa (9). Zbog porasta FSH-a, ubrzava se regrutiranje folikula i sve brže se smanjuje ostatak pričuve. Rezultat ubrzavanja folikularne faze je skraćenje menstruacijskog ciklusa za 2 do 3 dana. To se smatra prvim kliničkim znakom reproduktivnog starenja. Nadalje, povišene koncentracije FSH-a utječu na prerano sazrijevanje granulosa stanica u folikulima. Nesinkrono sazrijevanje granulosa stanica i oocite rezultira atrezijom i gubitkom folikula (18). Povišene koncentracije FSH-a i E2-a mogu prenegliti razvoj multiplih dominantnih folikula što se očituje povećanim brojem dizigotnih blizanačkih trudnoća u žena starije dobi (19).

## **10. DIJAGNOSTIKA OVARIJSKOG STARENJA**

Ovarijsko starenje odvija se neopaženo jer ne postoje očiti simptomi. Tek u kasnim stadijima će promjena u trajanju menstrualnog ciklusa skrenuti pozornost na reproduktivno starenje. No, zato ultrazvučna i biokemijska mjerenja mogu ukazati na to ranije (9). Nijedno trenutno mjerenje ne mjeri izravno broj svih jajnih stanica u jajniku, već mjere broj rastućih folikula i hormone koji su proporcionalni broju ukupnih oocita. Procjenom ovarijske rezerve može se danas predvidjeti reproduktivno starenje i uspjeh medicinski pomognute oplodnje (3).

Testovi pričuve jajnika su dio rutinske pripreme za medicinski pomognutu oplodnju. Indikacije za testiranje su dob veća od 35 godina, idiopatska neplodnost, pušenje, obiteljska pojava prijevremene menopauze, prijašnje ginekološke operacije, kemoterapija, radioterapija, prijašnji slab odgovor na stimulaciju ovulacije, povišen rizik hiperstimulacije te radi doziranja fertilitetnih lijekova (14).

### **10.1 Ultrazvučni biljezi**

#### **10.1.1 AFC**

Broj antralnih folikula (AFC) je ultrazvučna pretraga u kojoj se pomoću transvaginalnog ultrazvuka izmjeri broj i veličina antralnih folikula promjera 2-10 mm. Broj primordijalnih folikula je proporcionalan s brojem antralnih folikula u svakoj životnoj dobi. Starenjem se smanjuje broj primordijalnih folikula što se očituje u manjem broju antralnih folikula. AFC je visoko pouzdan kvantitativan pokazatelj pričuve folikula, ali ne pokazuje kvalitetu folikula, tj. oocita. Kvalitetu oocita je moguće najbolje procijeniti kliničkim odgovorom ovarijske stimulacije egzogenim FSH-om. Većina folikula koji odgovore na stimulaciju sadržavaju zdrave oocite. Unatoč tome, u više studija je pronađena povezanost AFC-a i ovarijskog odgovora u IVF-u (9). Također, broj antralnih folikula se odlično podudara s dobi i drugim pokazateljem ovarijskog starenja, razinom AMH-a (1). Broj antralnih folikula isto je u korelaciji s pojavom menopauzalne tranzicije (9). AFC je najčešće korišteni UZV marker zbog pouzdanosti, lakoće mjerenja i niske cijene (18).

### **10.1.2 Volumen i vaskularizacija ovarija**

Osim AFC-a, ultrazvukom se može izmjeriti volumen jajnika koji se smanjuje sa starenjem i protok krvi u jajniku. Pomoću Dopplera je uočen smanjeni protok krvi u stromi jajnika sa smanjenom ovarijskom rezervom (18). S druge strane, obujam jajnika ovisi o broju antralnih folikula posebno u folikularnoj fazi ciklusa kada nije prisutno žuto tijelo. Smanjenjem broja antralnih folikula, smanji se i volumen jajnika (3).

## **10.2 Endokrinološki biljezi**

### **10.2.1 Inhibin B**

Inhibin A i B su proizvodi granulosa stanica folikula. Inhibin A ima suprimirajući učinak na lučenje FSH-a iz hipofize dok inhibin B ima samo parakrini učinak u jajniku. Inhibin B primarno izlučuju antralni folikuli FSH-a osjetljive kohorte u folikularnoj fazi ciklusa te je stoga on marker ovarijske rezerve. Starenjem se smanjuje broj antralnih folikula i posljedično sekrecija inhibina B (9). Niske vrijednosti (40-45 pg/ml) imaju osrednju specifičnost (1). Niske koncentracije inhibina B su povezane s porastom FSH-a, padom kvalitete oocita i smanjenjem plodnosti. U studijama s IVF pacijenticama je dokazana povezanost niskih vrijednosti inhibina B, smanjenog ovarijskog odgovora i uspjeha IVF-a. Ipak, ovaj marker nije pouzdan jer inhibin B se ne snižava postupno s porastom godina. Smatra se kasnim markerom smanjene kohorte folikula. On je bolji marker ovarijske funkcije nego rezerve (9).

### **10.2.2 AMH**

Antimüllerov hormon (AMH) je proizvod granulosa stanica preantralnih i malih antralnih folikula. On djeluje autokrino i parakrino u jajniku smanjujući učinak FSH-a te ulazi u cirkulaciju gdje se mogu izmjeriti njegove koncentracije. Glavni izvor AMH-a su mali antralni folikuli koji imaju veći broj granulosa stanica i dobro su prokrvljeni. AMH je odličan marker ovarijskog starenja jer njegova razina u krvi izravno ovisi o broju malih antralni folikula koji su povezani s ovarijskom rezervom (9). Niska vrijednost (1,4-5,0 pmol/L) upućuje na smanjenu pričuvenu primordijalnih folikula u jajniku (1). Starenjem se smanjuje pričuvena antralnih folikula i smanjuje se vrijednosti AMH-a u cirkulaciji sve dok ne nestane u menopauzi. Na temelju njegovih vrijednosti se predviđa dob kada nastupa menopauza (9).

U IVF pacijentica serumski AMH je odličan marker broja preostalih oocita u jajniku, ovarijskog odgovora na stimulaciju, uspješnog začeća i porođaja djeteta (13). Također, služi kao marker u dijagnozi prijevremenog zatajenja ovarija jer u žena s tim poremećajem najbolje pokazuje istrošenost ovarijske rezerve (9). Pogodno je što se vrijednosti AMH-a mogu mjeriti u svakoj fazi ciklusa jer se serumske koncentracije ne mijenjaju kroz menstruacijski ciklus (moguće su male razlike od 7pmol/L između ciklusa) (13). AMH je test visoke osjetljivosti i specifičnosti (70 – 90 %) te se danas smatra najboljim testom ovarijske rezerve i starenja (1).

### **10.2.3 FSH**

Vrijednosti FSH-a rastu u folikularnoj fazi zbog snižene vrijednosti inhibina. Mjeri se 3. dana ciklusa te vrijednosti veće od 10 mlU/ml upućuju na smanjenu rezervu jajnika. Tijekom praćenja IVF pacijentica koje su imale FSH veći od 15 mlU/ml je pronađeno kako imaju manji uspjeh začeća. Najčešće se uz razinu FSH-a mjeri i estradiol 3. dana ciklusa. To povećava točnost testa jer smanjuje broj lažno negativnih rezultata. Zbog porata FSH-a, jače je stimulirana steroidogeneza te raste razina E2-a unatoč smanjenom broju folikula. Razina E2-a veća od 80 pg/ml upućuje na manjkavu ovarijsku rezervu (6). Mjerenje FSH-a i E2-a ima visoku specifičnost, ali nisku osjetljivost (1).

## **10.3 Dinamički testovi**

### **10.3.1 Provokacijski test klomifen citratom**

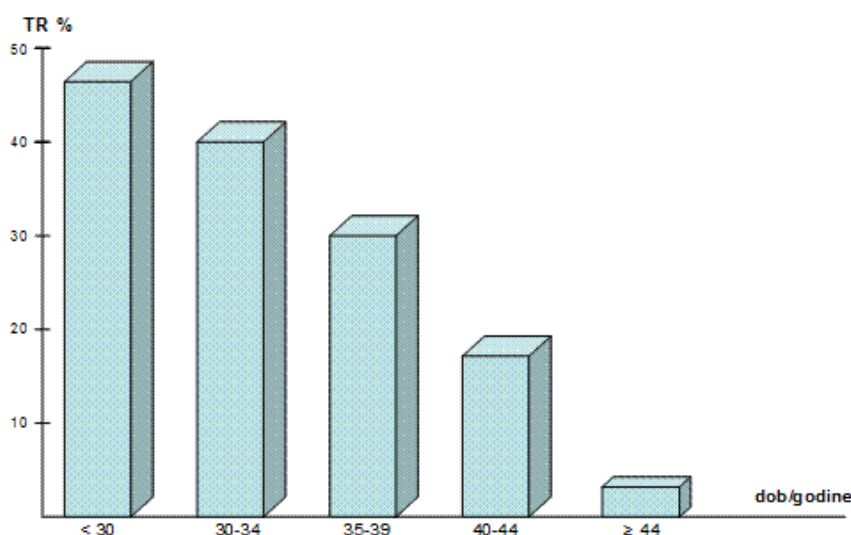
Provokacijski test klomifen citratom smatra se osjetljivijim testom ovarijske rezerve od mjerenja bazalnih razina hormona. Klomifen citrat je nesteroidni modulator estrogenskih receptora koji u hipofizi inhibira negativnu povratnu spregu estrogena na lučenje FSH-a. Test se provodi od 5. do 9. dana ciklusa kada pacijentica oralno uzima 100mg klomifen citrata dnevno. Prije toga se mjeri bazalna razina FSH-a i E2-a 3. dan ciklusa te samo FSH-a 10. dana ciklusa. Razine FSH-a su povišene u oba mjerenja u slučaju smanjene ovarijske rezerve. Ovaj test se provodi kad je FSH granično povećani 3. dana te u žena starijih od 40 godina (6).

## 11. MEDICINSKI POMOGNUTA OPLODNJA

U svijetu je rastući problem neplodnost. U razvijenim zemljama se procjenjuje kako je 12% parova neplodno što čini oko 100 milijuna ljudi na svijetu. Posljedica toga je sve niži natalitet i demografski pad. Procjenjuje se da će se za 30 godina smanjiti stanovništvo Europe za 15 milijuna. Taj trend je prisutan i u Hrvatskoj gdje je između 80 000 i 100 000 parova neplodno.

Medicinski pomognuta oplodnja je izraz koji obuhvaća sve metode i postupke liječenja neplodnosti koji dovedu do oplodnje, trudnoće i rođenja djece. Važnost MPO-a u današnjoj klimi depopulacije je doprinos 1-5% novorođenčadi godišnje od ukupnog broja živorođene djece. U svijetu se godišnje provede milijun IVF postupaka iz kojih se rodi oko 250 000-300 000 djece. U Hrvatskoj udio IVF djece iznosi 2,4% te zahvaljujući MPO-u porasla je fertilitet za 0,04 (s 1,38 na 1,42).

Prvi uspješan IVF postupak je bio 1978. godine kada je rođeno prvo dijete izvantjelesnom oplodnjom. Uspjeh je u počecima bio samo 1-5%. Od tada je ostvaren veliki napredak i uspjeh svježeg IVF ciklusa iznosi 40-50% danas. Još je viši postotak uspjeha IVF-a ako uračunamo i smrznute embrije te čini 60%. Uspjeh ovisi o dobi žene i broju te kvaliteti prenesenih embrija.



Slika 11. Postotak kliničkih trudnoća po svježem embriotransferu u određenim dobima (21)

Graf prikazuje kliničke trudnoće po embriotransferu u žena određenih dobnih skupina. Uspješnost je najviša u žena mlađih od 30 godina. Porastom godina smanjuje se uspjeh i u 40-tima je izrazito nizak. Poslije 44. godine pacijentice se usmjeruju na korištenje doniranih oocita jer je niski uspjeh IVF-a. Osim dobi, uspjeh ovisi i o embriotransferu. Zato se u prošlosti prenosilo tri ili više embrija kako bi se brže postigla trudnoća. Danas je ta ideja napuštena zbog rizika višestrukih trudnoća.

U devedesetima su razvijeni ICSI i zamrzavanje zametaka koji su unaprijedili IVF. Intracitoplazmatska injekcija spermija u oocitu služi za liječenje teškog oblika muške neplodnosti kada su spermiji dobiveni iz testisa ili u slučaju onkoloških pacijenata. U slučaju subfertilnog sjemena se preporuča ICSI jer je uspješnija oplodnja. Danas se ICSI koristi u 60-80% svih IVF ciklusa.

Planiranje vrste liječenja neplodnosti i prognoziranje uspjeha temelji se na dobi, debljini, trajanju neplodnosti dulje od jedne godine, anovulacijama, tubarnoj neplodnosti, endometriozu, abnormalnom postkoitalnom testu, subfertilnom ili infertilnom sjemenu, dosadašnjim nalazima obrade i dosadašnjoj reprodukciji. Strategija liječenja može biti pasivna kao kod smanjene plodnosti mlađeg para koja kraće traje ili aktivna. Uvijek se kreće od jednostavnijih oblika liječenja prema kompliciranijima gdje je IVF zadnja stepenica jer je skupa i rizična metoda.

U Europi je dostupnost IVF/ICSI-a iskazana brojem IVF centara na milijun stanovnika. Skandinavske zemlje su među najdostupnijim s 3 centra na milijun stanovnika. U zapadnim zemljama EU-e je u prosjeku 1-1.5 centar/milijun st. dok je najmanja dostupnost u Rusiji s 1 centrom na 20 milijuna stanovnika. U Hrvatskoj postoji 15 IVF centara što je svrstava uz bok skandinavskim zemljama. U zemljama EU, uključujući i Hrvatsku, provede se oko 1100 IVF/ICSI postupaka na milijun ljudi. Zemlja s najviše IVF postupaka je Danska koja ima malo manje od 2000 IVF postupaka na milijun ljudi. Unutar EU je dopuštena migracija neplodnih parova u svrhu liječenja u druge zemlje. Prosječno iznosi oko 10% parova koji se liječe MPO-om. Zemlje poput Španjolske i Češke imaju dopušteno darivanje gameta te zbog toga tamo dolaze parovi iz zapadne Europe. Države iz kojih najviše parova odlazi drugdje se liječiti su Italija i Njemačka koje imaju restriktivnije zakone (25).



## 11.1 Metode medicinski pomognute oplodnje

### 11.1.1 Osnovne metode MPO

Osnovne metode su intrauterina ili intratubarna inseminacija, in vitro fertilizacija, intracitoplazmatska mikroinjekcija spermija i prijenos gameta ili zigota u maternicu. Postupci mogu biti homologni gdje se parovi liječe vlastitim gametama ili heterologni u kojima se liječe doniranim gametama (25).

Intrauterina inseminacija (IUI) je postupak u kojem se sjeme unosi u maternicu pomoću katetera u vrijeme ovulacije. Koristi se za liječenje blage do umjerene neplodnosti u muškaraca, cervikalnog faktora kao uzroka neplodnosti u žena i idiopatske neplodnosti. Ako je uzrok cervikalni faktor, nepotrebna je prethodna stimulacija ovarija zbog nuspojava i cijene, a rezultati su dobri i bez nje (11% uspjeha po ciklusu). Kod muške neplodnosti i neobjašnjene neplodnosti, radi se stimulacija klomifren citratom prije inseminacije. U randomiziranoj studiji je skupina koja je prošla stimulaciju prije IUI (9,5%) imala veći uspjeh od kontrolne (3,3%).

In vitro fertilizacija (IVF) je postupak izvantjelesne oplodnje za liječenje ženske neplodnosti. Ovariji se stimuliraju tako da u jednom ciklusu sazrije oko 10 do 20 oocita. Egzogeni GnRH agonist i FSH ili hMG služe kako bi spriječili LH skok i ovulaciju prije uzimanja oocita. Sazrele jajne stanice se uzimaju transvaginalno uz pomoć UZV-a. Često su oocite genetski neispravne te je zato potrebno dobiti više oocita po ciklusu. In vitro se u laboratoriju jajne stanice i spermiji oplode te se zigota razvija do stadija blastociste kada se vraća transcervikalno u maternicu pod kontrolom UZV-a. Prije se više embrija vraćalo kako bi se povećala mogućnost trudnoće, ali time je porasla učestalost višestrukih trudnoća (6). Zato se danas najčešće vraća 1-2 embrija (25).

Intracitoplazmatska mikroinjekcija spermija (ICSI) je vrsta IVF-a za liječenje muške neplodnosti. U laboratoriju se u citoplazmu jajne stanice izravno injicira spermij. Zahvaljujući ICSI je moguća trudnoća u parovima gdje muškarac ima azoospermiju, a spermiji su dobiveni punkcijom ili biopsijom testisa.

Prijenos gameta u jajovod (GIFT) je metoda koja se najviše koristila u 1980-ima i 1990-ima te je danas zamijenjena s IVF-om. Najčešći razlog za tu metodu je neobjašnjiva neplodnost. Uzimanje jajnih stanica je identično kao u IVF-u te je glavna razlika u mjestu oplodnje. U GIFT-u se jajne stanice i spermiji

vraćaju u jajovod pomoću katetera tokom laparoskopije te se oplodnja događa u jajovodima. Invazivnost metode i veći rizik višestruke trudnoće (vraća se više od dvije jajne stanice) je razlog zašto se više ne koristi često.

Prijenos zigota u jajovod (ZIFT) je sličan GIFT-u, ali se umjesto gameta tokom laparoskopije prenosi zigota u jajovod. ZIFT je izbor medicinski pomognute oplodnje u rijetkim slučajevima kada nije mogući transcervikalni transfer zigote, tj. embrija u IVF-u (6).

### **11.1.2 Metode koje poboljšavaju rezultate ili smanjuju rizik MPO-a**

Napretkom MPO-a, razvile su se metode koje poboljšavaju rezultate ili smanjuju rizik IVF-a i ICSI-a. Te metode su kirurško dobivanje spermija (opstruktivna azoospermija), zamrzavanje oocita, spermija ili embrija, pomoć izlijevanju zametaka iz zone pelucide, in vitro maturacija oocita, preimplantacijska genska dijagnostika i posebne tehnologije za odabir kompetentnih oocita, spermija ili embrija (25).

Zamrzavanje oocita služi za odgađanje trudnoće u žena koje starenjem gube jajne stanice. Danas se najviše koristi kao onkofertilitetna metoda u žena na zračenju ili kemoterapiji.

Zamrzavanje embrija je često nužno tokom IVF procesa. U jednom ciklusu se iskoristi samo jedan do tri embrija za transfer u maternicu te se preostali zamrzavaju. Oni se u slučaju neuspjeha mogu iskoristiti u sljedećem pokušaju IVF-a. Zahvaljujući tome, žena ne mora ponovno prolaziti stimulaciju jajnika i uzimanje jajašca.

Donori oocita su potrebni u slučaju ovarijskog zatajenja ili smanjene ovarijske rezerve kada žene više nemaju vlastitih oocita. Također se koriste i za žene s nasljednim genetskim bolestima kako ne bi prenijele bolest potomku.

In vitro maturacija oocita je zasad eksperimentalna metoda. Iz nestimuliranih ovarija se aspiriraju antralni folikuli koji potom in vitro dozrijevaju u jajne stanice. Ova metoda bi se mogla koristiti u PCOS pacijentica u kojih je stimulacija veoma opasna jer lako dovede do sindroma hiperstimulacije ovarija. Nadalje, u budućnosti bi bilo moguće uzimati preantralne folikule koji bi in vitro sazrijeli omogućivši ženama na kemoterapiji kasniju trudnoću.

Preimplantacijska genska dijagnostika (PGD) omogućava identifikaciju genetskih neispravnosti u oocitama ili embrijima prije transfera u maternicu. Koristi se u svim indikacijama gdje postoji rizik nasljednih bolesti. Također se provodi zbog ponavljanih pobačaja, višestrukih neuspješnih IVF ciklusa i u starijoj dobi majke. Postoji više vrsta PGD-a ovisno o izvoru genetskog materijala, tj. stadiju u kojem se provodi biopsija. Prednost biopsije primarnog i sekundarnog polarnog tijela je što ne treba uzimati stanice zametka, ali istovremeno se ne mogu detektirati genetske nepravilnosti očevog genoma. Biopsija 6-8 staničnog embrija identificira majčin i očev genom, ali ponekad u slučaju mozaicizma ne uspije detektirati genomske abnormalnosti. Također, niža je stopa implantacije biopsiranih embrija. Posljednja je biopsija trofoektoderma, sloja iz kojeg se razvije placenta. Time se izbjegne uzimanje stanica embrija. PGD je metoda koja se brzo razvija te se smanjuje trošak i rizik iste. Smatra se kako bi u budućnosti i parovi bez poznatih genetskih abnormalnosti mogli napraviti preimplantacijsku gensku dijagnostiku u sklopu IVF-a. Time bi se smanjila potreba za transferom više od jednog embrija te rizik višestrukih trudnoća. Nadalje, smanjio bi se i rizik spontanog pobačaja jer izabrani embrio ne bi imao genetskih abnormalnosti (6).

### **11.1.3 Metode MPO koje su etički manje prihvatljive**

U određenim državama neke su metode zabranjene radi etičkih pitanja. Primjeri takvih postupaka su preimplantacijski probir embrija, zamjensko majčinstvo, socijalno zamrzavanje oocita, darivanje ostavljenih zametaka, postmortalna uporaba gameta ili zametaka, liječenje žena u postmenopauzi, liječenje bez partnera i eksperimentalni postupci na embrijima. Zakoni o MPO-i se razlikuju u različitim državama zbog vjerskih i kulturoloških razloga. Važno je naglasiti kako su IVF i ICSI odobreni u svim zemljama (25).

Zamjensko majčinstvo je metoda u kojoj oplodeno jajašce druge žene je preneseno u maternicu surogat majke koja nosi trudnoću. Razlog mogu biti anomalije uterusa, ponavljajući neobjašnjivi pobačaji ili trudnoća koja bi bila veliki zdravstveni rizik za majku. U mnogo zemlja je zabranjeni postupak zbog etičkih razloga (6).

## **11.2 Komplikacije MPO-a**

Određene komplikacije trudnoće su učestalije u medicinski pomognutoj nego prirodnoj trudnoći. Preeklampsija, placenta previja i abrupcija posteljice su češće u IVF trudnoćama. Višestruke trudnoće su, također, brojnije. Uz ovo, određene studije su povezale perinatalnu smrtnost, prijevremeno rođenje, nižu porođajnu težinu i zastoj fetalnog rasta s IVF trudnoćama.

Nađena je povezanost povećane pojave kongenitalnih anomalija u trudnoćama pomoću IUI-e i IVF-e naspram opće populacije. Ipak, treba uzeti u obzir starost i druge faktore populacije kojoj je potrebna MPO. Kada bi gledali podatke za određenu dob i trajanje subfertilneta, ne bi bilo razlike u riziku kongenitalnih anomalija između MPO-e i prirodno začetih. To dokazuje da uzrok anomalija nije u MPO-i već u parovima.

Povećani je rizik i epigenetskih promjena u MPO-i. Zbog manipulacije gametama ili neadekvatnih in vitro uvjeta dolazi do promjene u regulaciji imprinted gena (geni u kojima je samo jedan alel aktivan). Imprinted geni mogu utjecati na ponašanje, određene mentalne bolesti kao shizofreniju i bipolarni poremećaj te na ovisnost o alkoholu kasnije u životu. Nadalje, mogu povećati kardiovaskularni rizik i rizik za nastanak tumora. Zasada je od poremećaja imprintinga samo Beckwith-Wiedemannov sindrom dokazano povezan sa MPO-om.

U studijama koje su pratile psihomotorni i socioemocionalni razvoj djece začete MPO-om nije pronađeno odstupanje od razvoja prirodno začete djece (6).

OHSS je iatrogena komplikacija prejakog stimuliranja ovarija. Predložena je strategija podjele ciklusa kao rješenje OHSS-a. U prvom ciklusu se provede ovarijska stimulacija i sakupe oocite te se embriji zamrznu do sljedećeg ciklusa kada se provede transfer (26).

## **11.3 MPO u žena starije dobi**

Starenjem se smanjuje fertilitet te raste rizik u trudnoći za ženu i plod. Glavna strategija za subfertilne žene između 35. i 45. godine je stimulacija ovarijskog odgovora, a za žene između 45. i 50. godine donacija oocita.

Dob žena, evaluacija ovarijske rezerve i ovarijskog odgovora na stimulaciju su ključni u strategiji liječenja neplodnosti. Sa starenjem se smanjuje broj oocita i raste rizik aneuploidije zbog čega je potrebno više oocita nego u mlađih IVF pacijentica kako bi dobili jedan euploidan embrio. Procjenjuje se kako u žena od 35 do 37 godina je potrebno 5 oocita, od 38 do 40 godina treba 7, od 41 do 42 godine treba 10 i nakon 42 godine 20 oocita za jedan kromosomski normalan embrio. Kako bi dobili što veći broj oocita u jednom ciklusu, potrebna je stimulacija ovarija koja će dati maksimalni ovarijski odgovor.

Po ciklusu se obično uzima oko 15 jajnih stanica nakon stimulacije. Stimulacija jajnika može samo potaknuti razvoj antralnih folikula iz pričuve tog mjesečnog ciklusa te ne može proizvesti nove folikule. Stoga je nepotrebno povisiti doze gonadotropina iznad gornjih granica (FSH=300-375 IU/dan i LH=75-150IU/dan). LH nije nužan u svakom IVF postupku, ali se koristi kod starijih žena jer potiče steroidogenezu i folikulogenezu. Glavni pokazatelj uspjeha IVF-a je broj živorođene djece po ciklusu koji raste s većim brojem skupljenih oocita. Broj živorođene djece nakon svježeg embriotransfera ne raste nakon što je sakupljeno više od 15 oocita dok gledano za svježe trenutne i zamrznute kasnije embriotransfere zajedno broj živorođene djece raste s većim brojem oocita (>15). To ukazuje da u slučaju zamrzavanja embrija je potrebno sakupiti veći broj jajnih stanica.

Blaga stimulacija jajnika je protokol koji je bio predložen za žene starije od 35 godina jer se smatralo kako u standardnom protokolu dolazi do redukcije kvalitete oocita i embrija. Ovaj protokol je koristio niže doze gonadotropina koji su slabije stimulirali jajnik. To je dovelo do ograničenog broja oocita sakupljenih po ciklusu, većeg broja potrebnih ciklusa (duljeg vremena potrebnog za zatrudnjeti) i učestalijeg prekida ciklusa zbog preslabog odgovora jajnika. Danas je razvijen koncept prilagođavanja protokola ovarijske stimulacije ovisno o prognozi svake pacijentice. Ovisno o prognozi se određuje doza gonadotropina potrebna za dobivanje idealnog broja oocita. Jedan od najlošijih prognostičkih čimbenika je slabi odgovor jajnika na stimulaciju. Pacijentice sa suboptimalnim odgovorom su klasificirane u 4 kategorije prema POSEIDON-u. Slabi odgovor s urednim markerima ovarijske rezerve su grupa 1 (<35) i grupa 2 (≥35) dok s markerima koji su već ukazivali na smanjenje ovarijske rezerve su grupa 3 (<35) i grupa 4 (≥35). Za grupe 1 i 2 se preporuča povisiti dozu FSH-a i dodati LH zbog moguće smanjene osjetljivosti jajnika na gonadotropine dok taj postupak ne pomaže grupama 3 i 4.

Zamrzavanje oocita može biti iz medicinskih razloga (liječenje raka, endometrioza) ili nemedicinskih razloga (odgađanje trudnoće - socijalno zamrzavanje). Do prije desetak godina nije postojala mogućnost zamrzavanja oocita jer nisu bili zadovoljavajući ishodi. Glavna metoda očuvanja fertiliteta je bilo zamrzavanje embrija koje je etički upitno. Razvojem tehnologije je postignuti veliki napredak u očuvanju oocita te je danas to zlatni standard očuvanja plodnosti. Smatra se reproduktivnim osiguranjem te je smanjilo potrebu za donacijom oocita ili često neuspješnim MPO-om u starijoj dobi. Osnovni faktori uspjeha ove metode su dob žene u kojoj su sakupljene oocite i broj zamrznutih oocita. Bolji je uspjeh ako je žena mlađa od 35 godina te je 37 godina granica za uzimanje i zamrzavanje oocita.

Donacija oocita je postupak koji neplodnim ženama smanjene ovarijske rezerve ili s ponavljanim neuspješnim IVF postupcima omogućava trudnoću. Danas nije rijetka te je u SAD-u 2014. od ukupnog postotka svih IVF-a 12% bilo s doniranim oocitama. Koliko je metoda uspješna pokazuje podatak da je >35% žena s 50 godina kojima su bile donirane oocite uspjelo zatrudnjeti. Ženama iznad 44 godine kojima je rađena preimplantacijska genetska dijagnostika aneuploidije embrija nije nađen niti jedan kromosomski ispravan embrij u žena starih 46 godina. To dodatno potvrđuje kako je za žene u 40-tima često jedina mogućnost korištenje doniranih oocita. Iako je s doniranim oocitama moguća trudnoća, svejedno su prisutne sve komplikacije povezane s višom dobi majke (gestacijski dijabetes, tromboflebitis, proteinurija, prijevremeno puknuće plodovih ovoja, krvarenje, prijevremeni porod, niska porođajna težina, intrauterini zastoj u rastu, abnormalna placentacija). Osim rizika povezanih s dobi majke, dokazani su i rizici IVF postupaka s tuđim jajnim stanicama. Ovi rizici su nepovezani s dobi te se smatra kako su imunološke podloge. Embriji nastali od doniranih oocita su alogeni majci što može dovesti do majčine imunološke reakcije. Povišeni je rizik spontanog pobačaja i majčine smrti.

Trudnoća u starijoj dobi nosi više rizika te je danas najbolja metoda preimplantacijsko genetsko testiranje za aneuploidiju kojim se prije implantacije pronalaze genetske greške embrija. Time se spriječi transfer aneuploidnih embrija te smanji rizik pobačaja i kromosomskih sindroma u fetusa koji su česti u žena na kraju reproduktivnih godina. Zahvaljujući genetskom testiranju na aneuploidiju, trudnoća je u starijih žena sigurnija i za majku i za plod.

U zadnjih 30 godina je razvijena PGD strategija. Kroz godine se mijenjala biopsija genetskog materijala od blastomera, polarnih tijela do danas trofoblasta. Biopsija blastomera (3. dan embrijskog razvoja) je stara metoda koja je danas napuštena. Biopsija embrija u tom stadiju može naštetiti implantaciji. Nadalje, genetsko testiranje samo jedne stanice nije bilo dovoljno sigurno i pouzdano te FISH metoda koja se koristila nije pokrivala čitav kariotip već samo određene regije 9 kromosoma. Biopsija polarnih tijela omogućuje samo djelomičnu dijagnostiku jer ne može testirati očev genom. Također se genetski testira samo jedna stanica što nije dostatno te je neisplativo jer treba testirati sva polarna tijela. Jedina pozitivna strana je što ne oštećuje embrio. Biopsija trofoektoderma omogućava uzimanje 5-10 stanica trofoblasta iz kojeg se kasnije razvijaju plodove ovojnice. Time se ne narušava embrijev reproduktivni potencijal jer se ne uzimaju stanice unutarne mase blastociste. Ova metoda je dokazano sigurna, standardizirana i dovoljno informativna. Također je najekonomičnija od drugih metoda jer se testiraju blastociste koje su dosegnule 5.-7. dan razvoja što znači da je embrij sposoban za razvoj. Danas je ovo najčešća strategija PGD-a.

Nakon biopsije embrija provodi se testiranje čitavog kariotipa pomoću qPCR-a, aCGH, SNP-array ili NGS. Aneuploidija blastocista u starijih žena (srednje dobi 39 godina) je vrlo česta (50-55%) što potvrđuje potrebu za PGD-om. Samo izabrana euploidna blastocista bude transferirana u uterus. Preporučeno je provesti transfer samo jednog odabranog embrija kako bi se spriječile višestruke trudnoće.

U više randomiziranih kontroliranih studija je dokazana viša stopa implantacije i niža stopa pobačaja kod transfera euploidnih embrija nakon PGD-a naspram IVF ciklusa bez PGD-a. Jedan od glavnih problema u današnjoj preimplantacijskoj dijagnostici blastociste je mogućnost neprepoznavanja kromosomalnog mozaicizma. Zbog kasnije greške u segregaciji tokom mitoze, moguće je da je dio stanica embrija aneuploidno dok je druga populacija stanica euploidna. Biopsijom trofoektoderma sakupljamo 5-10 stanica dok čitava blastocista ima preko 100 stanica. Postoji mogućnost da biopsijom ne otkrijemo kako je dio embrija aneuploidan. Unatoč ograničavajućim faktorima, PGD je i dalje jedina djelotvorna strategija za smanjenje rizika trudnoće u starijih žena koje prolaze IVF (26).

#### **11.4 Potencijalni novi pristupi liječenju neplodnosti u starijih žena u budućnosti**

Potencijalni budući pristupi koji nadoknađuju gubitak plodnosti prije oplodnje su transfer kromosomalnih vretena iz starijih oocita u mlađe donirane oocite iz kojih su prethodno uklonjena vretena, transfer mitohondrija iz mlađih stanica u oocite starijih žena te kromosomalna terapija za ispravljanje aneuploidije oocita. Transfer mitohondrija donorovih stanica je kontroverzan te se danas provodi autologni transfer mitohondrija. Najbolje rezultate do sada su dali mitohondriji iz somatskih stanica ovarija (npr. granulosa stanice).

Tretmani koji kompenziraju neplodnost nakon oplodnje su kromosomalna terapija za ispravljanje aneuploidije zigote ili transfer pronukleusa. U posljednjem tretmanu partnerova sperma oplodi oocitu neplodne pacijentice i doniranu oocitu. Nakon oplodnje transferira se pronukleus iz pacijentičine zigote u mlađu zigotu iz koje je odstranjen pronukleus.

Moguća strategija rješavanja neplodnosti je izoliranje oogonija iz jajnika neplodnih žena iz kojih će se potaknuti razvoj autolognih oocita vraćanjem u jajnik ili in vitro. Druga strategija je izoliranje somatskih stanica koje su potom pretvorene u pluripotentne matične stanice iz kojih se razvijaju nove autologne oocite. Ipak, sve su ove metode još nedovoljno istražene te je efikasnost i sigurnost istih upitna. Postoje medicinske, genetičke, tehničke i etičke dvojbe oko njih te zasada nijedna nije u svakodnevnoj kliničkoj uporabi.

Inženjerstvo jajnih stanica je bio pokušaj obnavljanja reproduktivne kompetencije jajnih stanica koju gube starenjem. Otkrićem uloge mitohondrija u starenju i smanjenju kvalitete stanica, učinjen je transfer malog volumena citoplazme oocita mladih žena u jajne stanice subfertilnih starijih žena. Ovaj pokušaj je u 90-tima bio uspješan te je rezultirao s 50 živorođene djece. Unatoč tome, ishod je često neizvjestan i etički upitan zbog prisutnosti dvije različite mitohondrijske DNA u istoj jajnoj stanici. U SAD-u je od 2002. zabranjen ovaj postupak.

Kromosomalna terapija je molekularna strategija popravka aneuploidije u stanicama. To je nova metoda za koju se polaže mnogo nade u budućnosti. Do sad je bila samo eksperimentalna, ali bi jednog dana mogla potencijalno liječiti rak, kromosomalne poremećaje, aneuploidne oocite ili embrije u IVF-u.



U posljednjem desetljeću je provedeno više studija o nastanku novih gameta in vitro. Dugogodišnja je dogma kako u ovarijima nakon rođenja nema stvaranja novih oocita. Prva studija je provedena na miševima gdje su pronađene mitotički aktivne oogonije sposobne stvoriti nove oocite. Par drugih studija je poduprijelo ovu hipotezu dok su druge kritizirale i smatrale rezultate krivo protumačenima. Najnovija istraživanja su iznijela tvrdnju kako rast folikula u ovarijima može biti poduprijet infuzijom matičnih stanica koštane srži u miševa. Taj zahvat bi mogao pomoći razvoju folikula u žena starije reproduktivne dobi. Sve navedene metode stvaranja gameta in vitro zahtijevaju daljnja istraživanja te bi potencijalno u budućnosti mogli biti način liječenja neplodnih žena sa smanjenom ovarijskom rezervom i onkoloških pacijentica.

Edukacija i prevencija neplodnosti je jedna od najvažnijih mjera, posebno za buduće generacije. Životni stil poput prehrane, vježbanja, pušenja, konzumiranja alkohola i droga utječe na fertilitet. Nadalje, manjak svijesti o utjecaju starenja na smanjenje plodnosti i rastući trend odgađanja trudnoće najviše pridonose porastu neplodnosti. Glavna socijalna strategija je edukacija mlađih generacija budućih majki o lošem utjecaju životnih navika i starenja na smanjenje plodnosti (26).

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Doroteji Jukan-Pavić na uloženom trudu i vrijednim savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na potpori i razumijevanju koju su mi uvijek pružali tokom studiranja.

1. Šimunić V. Plodnost i neplodnost čovjeka. In: Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost; Medicinski potpomognuta oplodnja, IVF. Zagreb: Školska knjiga; 2012. p. 119–40.
2. Eurostat [Internet]. Available from: <https://ec.europa.eu/eurostat/web/main/home>
3. Baird DT, Collins J, Egozcue J, Evers LH, Gianaroli L, Leridon H, et al. Fertility and ageing. *Hum Reprod Update*. 2005;11(3):261–76.
4. Molina-García L, Hidalgo-Ruiz M, Cocera-Ruíz EM, Conde-Puertas E, Delgado-Rodríguez M, Martínez-Galiano JM. The delay of motherhood: Reasons, determinants, time used to achieve pregnancy, and maternal anxiety level. *PLoS One*. 2019;14(12):1–12.
5. Balasch J. Ageing and infertility: an overview. *Gynecol Endocrinol*. 2010;26(12):855–60.
6. Hoffman B, Schorge J, Schaffer J, Halvorson L, Bradshaw K, Cunningham F. Williams Gynecology, Second Edition. McGraw Hill Professional. 2012. 400–577 p.
7. Szamatowicz M, Szamatowicz J. Proven and unproven methods for diagnosis and treatment of infertility. *Adv Med Sci* [Internet]. 2020;65(1):93–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2019.12.008>
8. Baird D, Wilcox A, Weinberg C. Use of Time to Pregnancy to Study Environmental Exposures. *Am J Epidemiol*. 1986;124(3):470–80.
9. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: Mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev*. 2009;30(5):465–93.
10. Dechanet C, Anahory T, Daude JCM, Quantin X, Reyftmann L, Hamamah S, et al. Effects of cigarette smoking on reproduction. 2011;17(1):76–95.
11. Maheshwari A, Hamilton M, Bhattacharya S. Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. *Hum Reprod*. 2008;23(3):538–42.
12. Dunson DB, Baird DD, Colombo B. Increased infertility with age in men and women. *Obstet Gynecol*. 2004;103(1):51–6.

13. Cooke L, Nelson SM. Reproductive ageing and fertility in an ageing population. *Obstet Gynaecol.* 2011;13(3):161–8.
14. Santoro N, Isaac B, Neal-Perry G, Adel T, Weingart L, Nussbaum A, et al. Impaired Folliculogenesis and Ovulation in Older Reproductive Aged Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(11):5502–9.
15. Sadler TW. *Langmanova medicinska embriologija.* 10th ed. 2009. 374 p.
16. Cambridge University Press [Internet]. 2015. Available from: <https://www.cambridge.org/core/books/ultrasonography-in-gynecology/ultrasound-monitoring-of-ovulation-induction/89C73BB94C2B3FC85D8EC0A6E2A4E0A1>
17. Šimunić V. Normalan menstruacijski ciklus. In: *Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost; Medicinski potpomognuta oplodnja, IVF.* Zagreb: Školska knjiga; 2012. p. 45–67.
18. Li Q, Geng XD, Zheng W, Tang J, Xu B, Shi QH. Current understanding of ovarian aging. *Sci China Life Sci.* 2012;55(8):659–69.
19. Vollenhoven B, Hunt S. Ovarian ageing and the impact on female fertility [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research.* 2018;7:1–6.
20. Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc Roy Soc L.* 1963;158:417–33.
21. Poliklinika IVF [Internet]. Available from: <https://ivf.hr/contact/>
22. PROLEKSIS ENCIKLOPEDIJA [Internet]. Available from: <https://proleksis.lzmk.hr/51352/>
23. Hrvatska enciklopedija [Internet]. Available from: <https://www.enciklopedija.hr/>
24. Greene AD, Patounakis G, Segars JH. Genetic associations with diminished ovarian reserve: A systematic review of the literature. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(8):935–46.
25. Šimunić V. Medicinski pomognuta oplodnja. In: *Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost; Medicinski potpomognuta oplodnja, IVF.* Zagreb: Školska knjiga; 2012. p. 471–8.

26. Ubaldi F, Cimadomo D, Vaiarelli A, Fabozzi G, Venturella R, Maggiulli R. Advanced Maternal Age in IVF: Still a Challenge? The Present and the Future of Its Treatment. *Front Endocrinol.* 2019;10(94).

## **ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 16.4.1995. godine u Zagrebu.

Pohađala sam osnovnu školu Jure Kaštelana u Zagrebu koju sam završila 2010. godine. Tijekom osnovnoškolskog obrazovanja, odlazim na županijska natjecanja iz biologije gdje se zaljubljujem u prirodne znanosti. Srednjoškolsko obrazovanje sam stekla u 2. gimnaziji u Zagrebu. Učila sam engleski, njemački i francuski jezik tijekom školovanja. Također sam dugi niz godina trenirala tenis u teniskom klubu Chromos. Nakon gimnazije upisujem Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2014. godine. U slobodno vrijeme se aktivno bavim sportom te putujem.

Moji interesi u medicini su ginekologija i endokrinologija.