

# ANALIZA GENETIČKIH ČIMBENIKA KOAGULACIJE U INFERTILNIH PACIJENTICA

---

Jurić, Toni

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:832655>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE

Toni Jurić  
ANALIZA GENETSKIH ČIMBENIKA ZGRUŠAVANJA KRVI U NEPLODNIH  
PACIJENTICA  
Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE

Toni Jurić  
ANALIZA GENETSKIH ČIMBENIKA ZGRUŠAVANJA KRVI U NEPLODNIH  
PACIJENTICA  
Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Neda Smiljan - Severinski, dr. med.

Diplomski rad ocjenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Oleg Petrović, dr. med.
2. Doc.dr.sc. Aleks Finderle, dr. med.
3. Doc.dr.sc. Ozren Mamula, dr. med.

Rad sadrži 29 stranica, 4 slike, 2 tablice, 27 literaturnih navoda.

**Posveta i zahvala:**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr.sc. Nedi Smiljan-Severinski na iznimnom strpljenju,  
pomoći i razumijevanju tijekom pisanja diplomskog rada.*

*Hvala obitelji i prijateljima koji su mi bili najveća potpora tijekom 6 godina napornog rada.*

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Neplodnost</b> .....	1
<b>1.2. Nasljedni poremećaji zgrušavanja</b> .....	2
<b>1.3 Liječenje neplodnosti</b> .....	4
<i>1.3.1 Uspješnost metoda pomognute oplodnje</i> .....	6
<b>1.4. Povezanost nasljednih trombofilija i neplodnosti</b> .....	7
<b>2. SVRHA RADA</b> .....	10
<b>3. ISPITANICI I POSTUPCI</b> .....	11
<b>4. REZULTATI</b> .....	13
<b>4.1. Opći rezultati</b> .....	13
<b>4.2. Vrijeme do začeca (TTP)</b> .....	15
<b>4.3. Broj ciklusa MPO do začeca</b> .....	17
<b>5. RASPRAVA</b> .....	19
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	22
<b>7. SAŽETAK</b> .....	23
<b>8. SUMMARY</b> .....	24
<b>9. LITERATURA</b> .....	25
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	29

## **Popis skraćenica i akronima:**

AT- antitrombin

EGF - epidermalni čimbenik rasta

ET- embriotransfer

FET - transfer odmrznutih zametaka

FGF - čimbenik rasta za fibroblaste

FVL - faktor V Leiden

GIFT - intratubarni transfer gameta

ICSI - intracitoplazmatska spermalna injekcija

ITI - intratubarna inseminacija

IUI - intrauterina inseminacija

IVF - *in vitro fertilizacija*

MESA - mikrokirurška aspiracija spermija iz epididimisa

MPO - metode pomognute oplodnje

MTHFR - metilentetrahidrofolat reduktaza

PAI-1: inhibitor aktivatora plazminogena-1

PESA - perkutana aspiracija spermija iz epididimisa

TESA - testikulartna aspiracija spermija

TTP - vrijeme do trudnoće

VEGF - čimbenik rasta za vaskularni endotel

VTE- venska tromboembolija

ZIFT - intratubarni transfer zigota



# 1. UVOD

## 1.1. Neplodnost

Neplodnost je medicinsko stanje sa važnim medicinskim, psihološkim i ekonomskim posljedicama. Obzirom da obuhvaća par, a ne pojedinca, po mnogočemu se razlikuje od ostalih ginekoloških oboljenja. Neplodnost definiramo kao nemogućnost zanošenja uz redovite spolne odnose bez korištenja kontracepcije u razdoblju dužem od 12 mjeseci u žena mlađih od 35 godina života, odnosno u razdoblju dužem od 6 mjeseci u žena starijih od 35 godina (1). Fekundabilitet označava vjerojatnost začeća u jednom mjesečnom ciklusu, a ovisi o mnogim čimbenicima plodnosti (2). Procjenjuje se da otprilike 10% parova boluje od neplodnosti, dok dodatnih 10% boluje od smanjene plodnosti (2). Za parove kod kojih trudnoća nastupi, ali nakon dužeg razdoblja nego što bi bilo očekivano, koristimo izraz „smanjena plodnost“ ili „subfertilitet“. Studija koja je obuhvatila 200 zdravih parova koji su pokušavali začeti trudnoću pokazala je da je fekundabilnost prva tri mjeseca iznosila 25%, nakon čega se u sljedećih devet mjeseci istraživanja smanjila na 11% (3). Vjerojatnost zanošenja se smanjuje s dužim vremenom u kojem parovi pokušavaju ostvariti trudnoću, ali i sa uznapredovalom dobi majke.

Prevalencija neplodnosti, je najviša u Sjevernoj Africi, Bliskom Istoku, Oceaniji, Subsaharskoj Africi i Istočnoj Europi (4). U 2010.godini, 1.9% žena reprodukcijске dobi nisu uspjele roditi svoje prvorodeno dijete, a 10.5% žena sa prethodnim živorođenim djetetom nisu uspjele roditi naredno živorođeno dijete (4). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, kod 37% neplodnih parova uzročnik je bio ženski faktor, u 8% slučajeva uzročnik je bio muški faktor, a u 35% slučajeva kombinacija muškog i ženskog faktora (5). Faktori koji doprinose neplodnosti uključuju između ostalog pušenje cigareta, prekomjernu tjelesnu težinu, prekomjernu konzumaciju alkohola, kofein i stres (6-10).

## 1.2. Nasljedni poremećaji zgrušavanja

Trombofilije su naslijeđeni ili stečeni poremećaji zgrušavanja krvi koji dovode do povećanog rizika arterijske i venske tromboze. Nasljedne trombofilije su stanja u kojima genetska mutacija dovodi do oštećenja funkcije ili količine čimbenika u sustavu zgrušavanja. Neki autori trombofilije dijele na „slabije“ ili „jače“, ovisno o prisutnosti rizika za trombozu do kojeg mogu dovesti (11). Testiranje za trombofilije se savjetuje kao dio sekundarne prevencije nakon provocirane i neprovocirane venske tromboembolije (VTE), zatim kao dio primarne prevencije kod članova obitelji oboljelog od VTE i kod članova obitelji koji razmatraju terapiju estrogenom ili planiraju začće (11). Do kliničkog oboljenja i posljedica mogu dovesti mutacije prirodnih inhibitora čimbenika koagulacije, a to su između ostalih, inhibitori antikoagulacijskog puta proteina S i proteina C, antitrombina (AT) i inhibitora vanjskog puta zgrušavanja. Nasljedni manjak antitrombina se najčešće prezentira trombozom vena gdje su najčešće zahvaćene površinske vene nogu, femoralna i ilijačne vene (12).

Klinički su značajne i mutacije čimbenika koagulacije faktora V Leiden (FVL), inhibitora aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) i metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR). Mutacija FVL je relativno česta u ljudi, a postoje dokazi da je pomogla očuvanju vrste. Primjerice, mutacija smanjuje rizik od gubitka krvi pri porodu, a smatra se i da pospješuje preživljenje za vrijeme sepse (13). Inhibitor aktivatora plazminogena-1 je čimbenik fibrinolize čiji polimorfizam u promotorskoj regiji SERPINE1 (PAI-1) gena dovodi do tzv. „up regulacije“ i pretjerane ekspresije. Posljedica navedenog procesa je povećana koncentracija PAI-1 u plazmi i, posljedično, inhibicija fibrinolize (14). Na povišenje PAI-1 utječu i hipoksija, čimbenik rasta za fibroblaste (engl. *fibroblast growth factor*, FGF), čimbenik rasta za vaskularni endotel (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), epidermalni čimbenik rasta (engl.

*epidermal growth factor*, EGF) i interleukin 1. Također, koncentracija PAI-1 u plazmi je povezana i sa aterosklerozom i infarkcijom miokarda, kao i sa inzulinskom rezistencijom, opetovanim gubitkom trudnoće, preeklampsijom i sindromom policističnih jajnika (14). Vjeruje se da povišenje PAI-1 može spriječiti invaziju trofoblasta preko inhibicije degradacije izvanstaničnog matriksa i akumulacije fibrina, što može dovesti do preeklampsije i zastoja rasta fetusa. Istovremeno, PAI-1 potiče migraciju i invaziju stanica endometrija i na taj način potiče endometriozu (14). Povezanost mutacija PAI-1 i komplikacija trudnoće se još uvijek istražuje. Mikrovaskularne okluzije decidue se smatraju potencijalnim uzrokom neuspješne implantacije nakon liječenja metodama medicinski pomognute oplodnje (13). Također, povezanost mutacija i neplodnosti u žena je zanimljiva i još uvijek nedovoljno istražena tema.

Trombofilije u trudnoći mogu biti iznimno opasne, pogotovo obzirom da je hiperkoagulabilnost fiziološka pojava u trudnoći. Kombinacija ovih dvaju stanja može dovesti do ozbiljnih komplikacija u fetalnom razdoblju, poput placentalne tromboze i posljedične insuficijencije placente (13). Postoje dokazi da trombofilija sudjeluje i u nastanku preeklampsije i kasnog gubitka ploda. Zanimljivo, premda je mutacija gena za čimbenike zgrušavanja povezana s gubitkom ploda, zastojem fetalnog rasta, preeklampsijom i abrupcijom posteljice nakon 14 tjedana gestacije, postoje dokazi da mutacije djeluju protektivno prije 10. tjedna gestacije (13). Ono što se zasigurno zna jest da je balans između koagulacije i fibrinolize iznimno bitan u prevenciji gubitka trudnoće. Nesklad može dovesti do akumulacije fibrina u interviloznim prostorima, tromboze u venama decidue i, posljedično, do problema u cirkulaciji posteljice (14).

Premda ne postoje čvrsti dokazi oko djelotvornosti lijeka, heparin se danas ipak koristi u liječenju nositelja mutacija čimbenika zgrušavanja sa neuspješnim implantacijama (13). Smatra se da bi heparin mogao imati pozitivno djelovanje na implantaciju ne samo kao antikoagulantni lijek, već i preko poboljšanja receptivnosti endometrija i preko decidualizacije

stromalnih stanica endometrija. Također, heparin bi mogao imati pozitivan učinak na adhezivnost i invazivnost trofoblasta. Iako postoje dokazi da bi nefrakcionirani heparin ili heparin male molekularne mase mogao povećati broj živorođene djece kod žena sa ranijim neuspješnim implantacijama, dokazi nisu dovoljno čvrsti i potrebna su daljnja istraživanja (13).

### **1.3 Liječenje neplodnosti**

Parovima se kao prvi korak preporuča promjena životnog stila koja uključuje prestanak pušenja, smanjenu konzumaciju kave i alkohola te redukciju tjelesne težine ukoliko je potrebno. Terapijske intervencije uključuju lijekove, operacije i/ili metode pomognute oplodnje (MPO).

Obzirom da su kod 18 do 25% parova koji se liječe od neplodnosti prisutni poremećaji funkcije jajnika, indukcija ovulacije je važna terapijska metoda (15). Najčešći poremećaji koji dovode do anovulacije su hipogonadotropni hipogonadizam, sindrom policističnih jajnika, periferne endokrinopatije, poremećaji hipofize i hiperprolaktinemija (2). Cilj indukcije ovulacije je indukcija jednog folikula i uspješna trudnoća s jednim djetetom uz minimalan rizik od sindroma hiperstimulacije jajnika. Peroralni lijekovi koji se koriste za indukciju su letrozol, klomifen citrat, metformin (kod hiperinzulinemije kao dio sindroma policističnih jajnika) i agonisti dopamina (u slučajevima anovulacije zbog hiperprolaktinemije).

Intrauterina inseminacija (IUI) je metoda u kojoj se koncentrirani i pokretni spermiji direktno umetnu u šupljinu maternice. Za uspješnu izvedbu IUI, potrebno je prisustvo ovulacije, prohodnost barem jednog jajovoda i dovoljan broj pokretnih spermija. Kontraindikacija za ovu metodu je aktivna infekcija u području zdjelice, maternice i cerviksa. Vjeruje se da broj trudnoća znatno pada nakon trećeg ciklusa IUI, zbog čega europske smjernice preporučaju tri

do šest ciklusa, ovisno o uzroku neplodnosti (16). Nakon ovog broja ciklusa koji ne rezultiraju trudnoćom, preporuča se prelazak na druge metode pomognute oplodnje.

*In vitro fertilizacija* (IVF) je metoda u kojoj su jedna ili više jajnih stanica aspirirane iz folikula jajnika, nakon čega se jajne stanice oplode u laboratoriju („in vitro“), nakon čega slijedi transfer jednog ili više embrija u šupljinu maternice. Cijeli proces traje otprilike dva tjedna i naziva se „IVF ciklus“. Aspiracija oocita se odvija pod nadzorom transvaginalnog ultrazvuka. Nakon aspiracije, jajna stanica se u kontroliranim uvjetima spaja sa spermijima.. IVF kao metoda pomognute oplodnje se koristi kod žena kod kojih je dijagnosticirano oštećenje jajovoda, kod neplodnosti zbog muškog faktora, smanjene ovarijske rezerve ili njezinog potpunog nedostatka, zatim kod insuficijencije jajnika i kod drugih oboljenja kad ne pomažu ostale, prethodno opisane metode postizanja trudnoće. Prema istraživanju iz 2020.godine, u žena mlađih od 35 godina najviša stopa nataliteta uz IVF iznosi 67.9%, dok u žena iznad 40 godina iznosi 21.9% (17). Smanjeni uspjeh kod žena starijih od 40 godina je povezan sa smanjenim odgovorom jajnika na stimulaciju gonadotropinima i smanjenim brojem jajnih stanica, kao i narušenom implantacijom zbog slabije kvalitete jajne stanice. Premda transfer većeg broja embrija povećava šansu za trudnoćom, istovremeno povećava i šansu višepodne trudnoće. Kako bi se ta mogućnost smanjila na minimum, dogovoreno je da se u jednom ciklusu ne transferira više od dva embrija.

Osim gore navedenih, postoje i ostale metode pomognute oplodnje koje se rjeđe koriste. Jedna od njih je intracitoplazmatska injekcija spermija (ICSI) kod koje se spermij izravno injicira u citoplazmu jajne stanice. Najčešće se koristi kad uzrok neplodnosti leži u muškom čimbeniku, a posebnost ove metode leži u tome da je oplodnja moguća i u slučajevima kad je broj spermija ispod 100 (2). U slučajevima azospermije i aspermije, postoje metode kojima se spermiji mogu ekstrahirati direktno iz epididimisa ili testisa: perkutana aspiracija spermija iz epididimisa (PESA), testikularna aspiracija spermija (TESA) i mikrokirurška aspiracija

spermija iz epididimisa (MESA). ICSI se rjeđe koristi iz razloga što je za njegovu primjenu potrebna visokotehnološka oprema koju nemaju svi laboratoriji. Intratubarna inseminacija (ITI) uključuje direktnu inseminaciju sjemena u jajovod. Provodi se prije ovulacije, a za izvedbu je potreban barem jedan prohodan jajovod. Transfer gameta (GIFT), odnosno transfer zigota intratubarno (ZIFT) su metode kod kojih se u jajovod inseminiraju jajna stanica i spermij, odnosno oplođena jajna stanica. U slučaju da je kod muškog partnera prisutna potpuna azoospermija, da u epididimisu i testisu nisu prisutni produkti spermatogeneze ili se pokušavaju izbjeći nasljedne i imunološke bolesti, moguća je i heterologna inseminacija. U ovoj metodi se koristi sjeme donora, a može se primjenjivati u prirodnom i induciranom ciklusu. Za kraj, kao nadopunu IVF metodi može se koristiti krioprezervacija, odnosno zamrzavanje i odmrzavanje zametaka i gameta. Ovakav postupak se može koristiti za pohranu zametaka za transfer u budućnosti. Zameci su krioprezervirani na  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  u tekućem dušiku gdje se mogu čuvati, po odredbama zakona, do deset godina (2).

Kao i svaki medicinski zahvat, MPO mogu izazvati komplikacije koje su rijetke i najčešće ne izazivaju trajne posljedice. Najčešća komplikacija nakon terapije induktorima ovulacije je višeploidna trudnoća koja se javlja u 18 do 25% slučajeva, zatim nuspojave samih lijekova u 5 do 8% slučajeva, sindrom hiperstimulacije jajnika u 4 do 9% slučajeva i izvanmaterična trudnoća u 4 do 5% slučajeva. Znatno rjeđe se događaju heterotopična trudnoća, hidatidozna mola i hiperlipoproteinemija (2). Najčešća komplikacija nakon transvaginalne aspiracije jajne stanice je neuspješna aspiracija koja se događa u 2% slučajeva. Krvarenje iz rodnice, intraperitonealno krvarenje i upala organa zdjelice se susreću izuzetno rijetko (2).

### ***1.3.1 Uspješnost metoda pomognute oplodnje***

Uspjeh MPO ovisi o mnogo faktora, između ostalog o odabranoj metodi, dobi pacijentice, komorbiditetima i iskustvu osoblja u IVF centrima. Studija na preko 1000 IVF centara (2)

pokazala je da 15.6-28% pokušaja IVF-om završi sa kliničkom trudnoćom. 73% trudnoća završi sa porođajem živog djeteta, dok je izvanmaterična trudnoća komplikacija prisutna u 4.5 do 7.5% trudnoća. 32.1% trudnoća završi porodom nedonoščeta, a 2.1% sa malformacijama. U 18 do 25.5% dolazi do višepodne trudnoće, u 36% slučajeva dijete se rađa sa niskom porođajnom težinom, a 43 do 54% porođaja se završi carskim rezom (2).

#### **1.4. Povezanost nasljednih trombofilija i neplodnosti**

Povezanost nasljednih trombofilija sa neplodnošću je iznimno kontroverzna tema. Trenutno među reprodukcijским endokrinolozima i reprodukcijским imunolozima ne postoji konsenzus oko veze ovih dviju medicinskih pojava. Postoje brojna istraživanja koja govore u prilog povezanosti, ali i istraživanja koja govore protiv toga. Egipatska retrospektivna kohortna studija na preko 2500 žena (18) je ispitala pojavnost trombofilija u žena sa tri ili više neuspješna pokušaja MPO. Kod 17.4% ispitanica je dokazana homozigotna mutacija za PAI-1, dok je kod 67.5% testiranjem potvrđena heterozigotna mutacija istog čimbenika. Također, kod 9.8% i 45.1% žena je dokazana homozigotna, odnosno heterozigotna mutacija za MTHFR A, dok je kod 7,7% i 35.3% potvrđena homozigotna, odnosno heterozigotna mutacija za MTHFR C. Nadalje, kod više od trećine žena (35.8%) su dokazane dvije homozigotne mutacije za čimbenike koji su povezani s trombofilijom, a kod još jedne trećine (34.6%) jedna homozigotna mutacija. Premda u ovoj studiji nije bilo usporedbe sa zdravom populacijom, vidljiva je velika prevalencija mutacija čimbenika zgrušavanja kod žena sa neuspješnim postupcima MPO.

Retrospektivna „case-control“ studija u Grčkoj je pokazala povezanost između PAI-1 4G/5G polimorfizma i neobjašnjene neplodnosti. U studiji su sudjelovale 222 žene, od kojih je 115 imalo problem neutvrđenog uzroka neplodnosti, a ostale nisu imale problema sa zanošenjem

niti su imale komplikacije u kasnijoj trudnoći. Studija je dokazala da bi navedeni polimorfizam mogao biti koristan prediktor kod neobjašnjene neplodnosti (14).

I „case-control“ studija (36 ispitanica sa idiopatskom neplodnošću, 65 ispitanica sa ponavljajućim spontanim pobačajima i 62 zdrave žene - kontrolna grupa) je ispitivala povezanost FVL i MTHFR mutacija i neplodnosti (19). Pokazalo se da je učestalost FVL mutacija značajno viša u neplodnih ispitanica (30.6%) i u ispitanica sa ponavljajućim spontanim pobačajima (20%) nego kod zdravih žena (0%). Također, učestalost MTHFR mutacija se pokazala značajno viša kod žena sa ponavljajućim spontanim pobačajima (63.1%) nego kod zdravih žena (38.7%).

Jedna studija je ispitivala povezanost između mutacija PAI-1 i MTHFR te učestalosti spontanih pobačaja (20). U studiju je bilo uključeno 150 žena sa PAI-1 mutacijom, od čega je 100 žena u anamnezi imalo spontani pobačaj, dok je 50 žena sa normalnom trudnoćom činilo kontrolnu skupinu. Također, ukupno 138 žena je imalo obje mutacije, PAI-1 i MTHFR. Studija je pokazala statistički značajnu povezanost PAI-1 mutacije i spontanih pobačaja, kao i povezanost obje mutacije i pojavnosti spontanih pobačaja. Ova studija je dokazala da mutacije koje dovode do trombofilija mogu dovesti i do problema s reprodukcijom čak i nakon početno uspješnog začeća.

Suprotno prethodnim rezultatima, istraživanje kojeg su proveli Göpel i sur. (21) je pokazalo da mutacije FVL imaju pozitivan učinak na embriotransfer u prvom ciklusu. Ispitanice sa navedenom mutacijom su imale gotovo dvostruko višu stopu uspješnog transfera od ispitanica bez mutacija (90% naspram 49%). Također, medijan neuspješnih transfera je bio niži kod žena sa mutacijom nego kod žena bez mutacije (0 i 2).

Zanimljivo je nizozemsko istraživanje u gradu Leidenu u koje su uključeni muškarci i žene. Istraživana je povezanost FVL mutacije i plodnosti (u ovom istraživanju plodnost su definirali



kao vrijeme između početka braka i rođenja prvog djeteta) (22). U muškaraca je FVL mutacija pozitivno korelirala sa plodnošću. Nakon 3 mjeseca braka, 67% muškaraca sa mutacijom je začelo dijete, naspram 19% muškaraca koji nisu bili nositelji mutacije. Nakon 6 mjeseci, sveukupno 75% muškaraca sa mutacijom i 34% muškaraca bez mutacije je začelo dijete. U nije dokazana povezanost FVL mutacije i plodnosti. Svakako je važno naglasiti da je u samo 4.3% ukupne populacije bila dokazana FVL mutacija. Također je važno za naglasiti da je riječ o retrospektivnom istraživanju gdje su svi podaci prikupljeni iz registra brakova i registra rođenih, tako da postoji mogućnost da su određene trudnoće pobačene i nisu upisane u registre.

## 2. SVRHA RADA

Postoje brojni prijevori oko povezanosti nasljednih trombofilija i neplodnosti, odnosno uspješnosti liječenja metodama medicinski pomognute oplodnje. Metode medicinski pomognute oplodnje su relativno nove metode liječenja u medicini. Veliki broj parova pati od neplodnosti, tako da je optimizacija MPO jedan od prioriteta u medicini. Cilj istraživanja je bio ispitati povezanost između nasljednih trombofilija i vremena liječenja koje je potrebno za ostvarenje začeca postupcima MPO (engl. *Time to pregnancy*, TTP), odnosno broja ciklusa MPO do postignutog začeca.

Navedeni rezultati bi mogli pomoći u savjetovanju parovima koji se liječe od neplodnosti, a kod kojih je prisutna trombofilija, odnosno u odluci za uvođenje dodatnog medikamentoznog liječenja uz postupke MPO, s ciljem povećanja učinkovitosti metoda MPO.

Hipoteze istraživanja su:

- postoji povezanost između nasljednih trombofilija i TTP
- postoji povezanost između nasljednih trombofilija i ukupnog broja MPO potrebnih za ostvarenje začeca

### 3. ISPITANICI I POSTUPCI

U istraživanje su uključene ispitanice koje su liječene zbog neplodnosti na Zavodu za humanu reprodukciju Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Sve ispitanice uključene u istraživanje su začele trudnoću, dok tijekom i ishod trudnoće nisu uključeni u istraživanje. Ukupno su obuhvaćene 493 ispitanice koje su se liječile tijekom 11 godina, od listopada 2008. godine do studenog 2019. godine. Ispitanice su u navedenom razdoblju začele ukupno 634 trudnoće uz postupke MPO. Podaci potrebni za istraživanje su prikupljeni retrospektivno, analizom medicinske dokumentacije Zavoda za humanu reprodukciju, te iz bolničkog informatičkog sustava (BIS). Prikupljanje podataka je obavljeno uz suglasnost Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Rijeka uz poštivanje Etičkog kodeksa i zaštitu privatnosti ispitanica. Podaci koji su analizirani u istraživanju uključuju sljedeće:

- 1.) životna dob ispitanice
- 2.) kalendarska godina početka liječenja
- 3.) kalendarska godina u kojoj je došlo do začeća
- 4.) metoda medicinski pomognute oplodnje, kojom je ostvareno začeće
- 5.) broj postupaka MPO (IUI, IVF-ET/ICTS, FET) do začeća
- 6.) broj trudnoća koje je ispitanica začela
- 7.) broj živorođene djece
- 8.) prisutnost/odsutnost mutacija gena koji su povezani trombofilijom (PAI, MTHFR, ostale rjeđe mutacije – faktor II, faktor V).
- 9.) U ispitanica sa dokazanim mutacijama zabilježena je vrsta i tip nasljeđa mutacije (homozigotna ili heterozigotina mutacija)
- 10.) dokazani ginekološki komorbiditeti.

Rezultati su analizirani statističkim programom „STATISTICA“ (<http://www.statsoft.com/Products/STATISTICA-Features/Version-12>). Rezultati su tumačeni uz prihvatljivu razinu značajnosti  $p < 0,05$ .

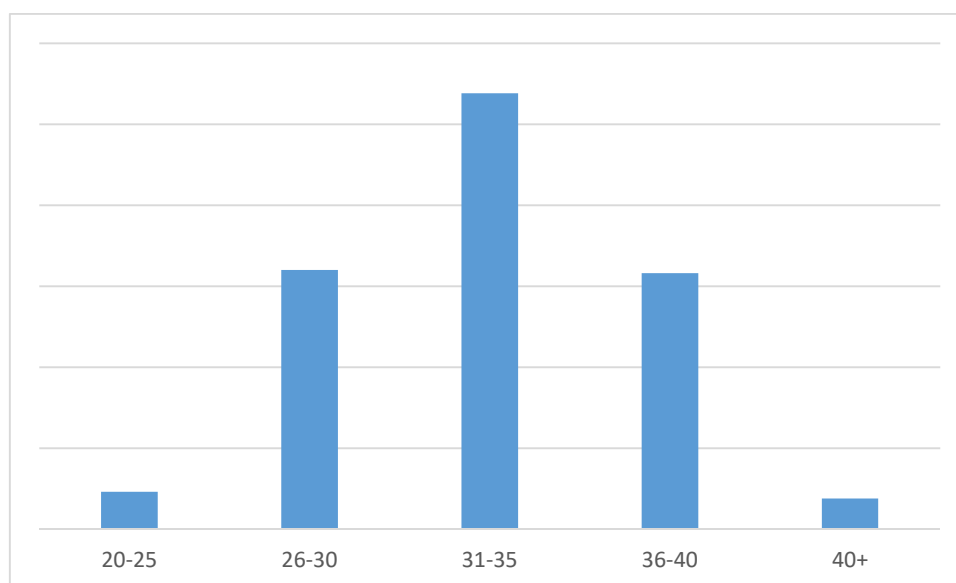
Za potrebe istraživanja, ispitanice su podijeljene u tri skupine:

- 1) homozigoti za barem jednu od istraživanih mutacija (N =60),
- 2) heterozigoti (N =54) i
- 3) ispitanice bez mutacija (N = 379).

Nakon toga je istraženo postoji li značajna razlika između ispitanica bez mutacije i homozigota, ispitanica bez mutacije i heterozigota, odnosno između homozigota i heterozigota za dva čimbenika: broj mjeseci do trudnoće (TTP) i broj MPO od početka liječenja neplodnosti do začete trudnoće.

## 4. REZULTATI

Srednja vrijednost dobi ispitanica na početku liječenja neplodnosti bila je 32.89 godina ( $SD \pm 4.11$ ). Dobnu strukturu ispitanica prikazuje Slika 1.

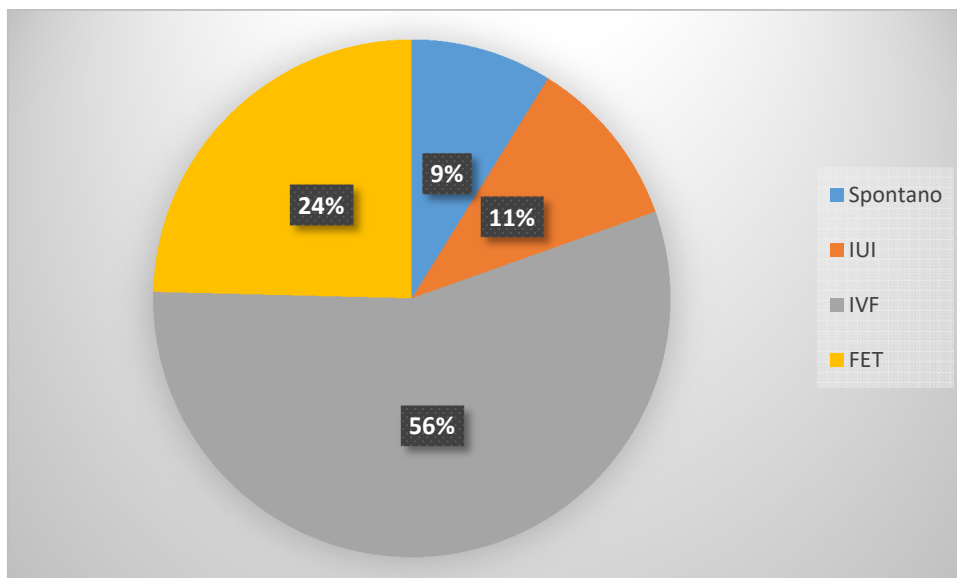


Slika 1. Struktura ispitanica ovisno o životnoj dobi na početku liječenja

Najveći udio ispitanica (42.77%) je liječenje započeo u dobi od 31 do 35 godina života. Općenito, većina ispitanica (71.86%) je liječenje započela u mlađoj reproduktivnoj dobi.

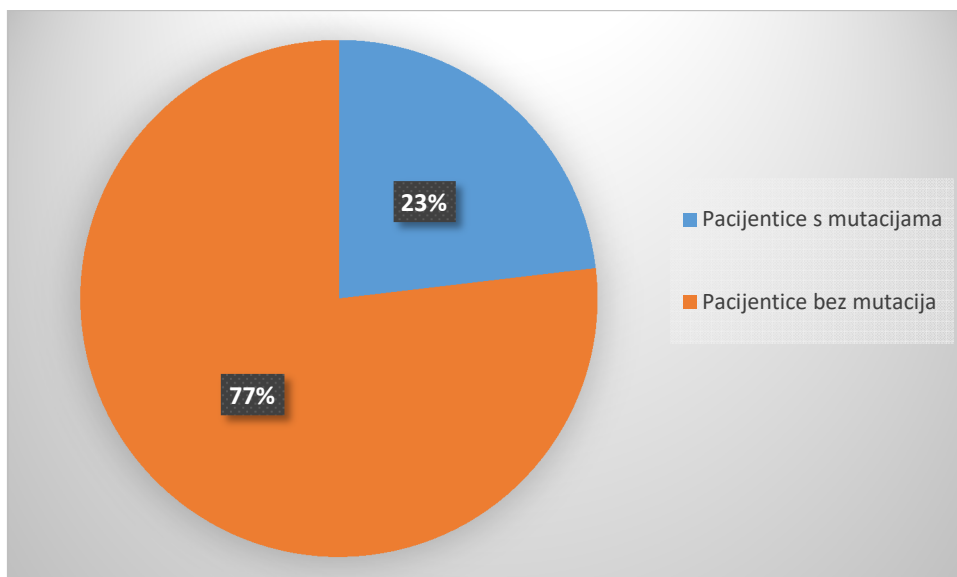
### 4.1. Opći rezultati

Od ukupnog broja začelih trudnoća ( $N = 634$ ), najveći broj je začel nakon postupka *in vitro* fertilizacije (IVF/ ET); ( $N=354$ , 56%). Prijenosom zamrznutih zametaka (FET) je začeto 24% trudnoća ( $N=156$ ), a homolognom inseminacijom (IUI) 11% trudnoća, ( $N=68$ ). Najmanji udio trudnoća je začel spontano ( $N=56$ , 9%), u razdoblju između liječenja postupcima MPO (Slika 2).



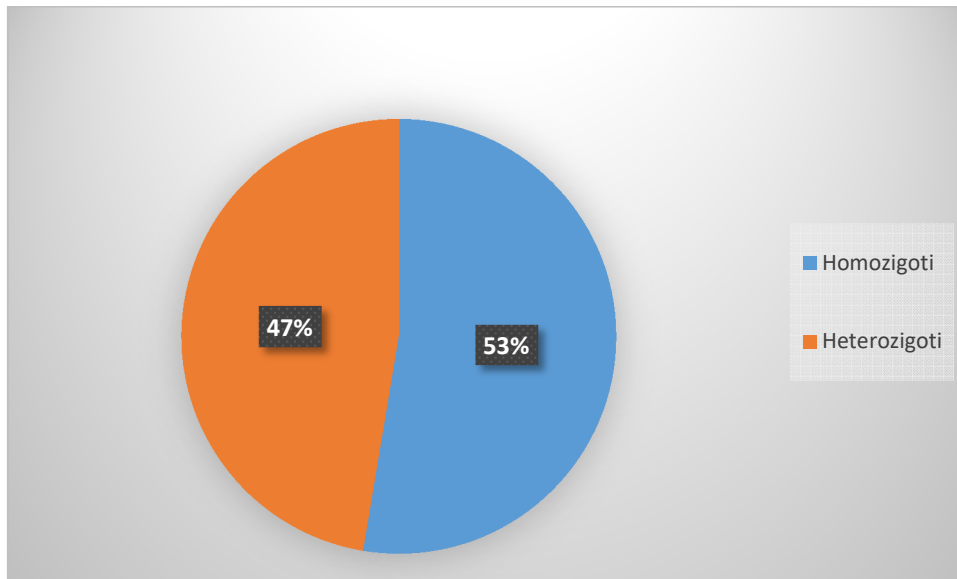
Slika 2. Udio začelih trudnoća prema metodi liječenja (postupak MPO)

U većine ispitanica koje su bile uključene u istraživanje, više od tri četvrtine nisu imale dijagnosticiranu nijednu mutaciju gena koja se povezuje s nasljednom trombofilijom (N=379, 77%). Manji broj ispitanica (N=114, 23%) su imale dijagnosticiranu barem jednu mutaciju (ili više njih), heterozigotnu ili homozigotnu (Slika 3).



Slika 3. Udio ispitanica s mutacijama i ispitanica bez mutacije gena povezanih s nasljednom trombofilijom

U ispitanica sa dijagnosticiranim mutacijama (N = 114), udio homozigota i heterozigota je bio podjednak. Slika 4 prikazuje raspodjelu i odnos ispitanica homozigota i heterozigota.



Slika 4. Udio ispitanica koje su homozigoti za mutaciju i ispitanica koje su heterozigoti za barem jednu mutaciju gena

#### 4.2. Vrijeme do začeca (TTP)

Prvi ispitivani čimbenik je vrijeme liječenja postupcima MPO do začeca (TTP), izraženo u mjesecima. U Tablici 1 prikazano je prosječno vrijeme do začeca u ispitanica bez dokazanih mutacija i iznosilo je 7.79 mjeseci ( $SD\pm 9.45$ ). Nasuprot tomu, ispitanicama koje su bile homozigoti za jednu od dokazanih mutacija je bilo potrebno prosječno 13.58 mjeseci ( $SD\pm 14.22$ ) do začeca. Sličan rezultat je zabilježen i u ispitanica koje su heterozigoti za barem jednu mutaciju, a prosječno vrijeme do začeca iznosilo je 12.28 mjeseci ( $SD\pm 11.74$ ).

Tablica 1. Dužina liječenja do začeća (mjeseci)

	<b>Mjeseci do začeća</b>	<b>Varijanca</b>	<b>P</b>
	<b>SV ± SD</b>		
<b>Ispitanice bez mutacija</b>			
(N =379)	7.79±9.45	89.56	
<b>Homozigoti</b>			
(N =60)	13.58±14.22	204.35	0.0003*
<b>Heterozigoti</b>			
(N =54)	12,28±11,74	139,83	0.003*

\*p < 0,05 – statistički značajno, homozigoti i heterozigoti se ne razlikuju značajno

SV=srednja vrijednost, SD= standardna devijacija

Usporedbom dužine liječenja do začeća u ispitanica bez mutacija i homozigota, dokazano je da su homozigotne mutacije u ispitanica povezane sa značajno dužim razdobljem liječenja neplodnosti postupcima MPO (p=0.0003). Slično tomu, ispitanice sa heterozigotnim mutacijama gena imaju značajno duže vrijeme liječenja postupcima MPO u odnosu na one bez mutacija (p=0.003). Razlika u dužini liječenja između homozigota i heterozigota nije dokazana. (p=0.52, Tablica 1).

Dobiveni podaci ukazuju da postoji značajna razlika između ispitanica bez mutacije za jedan od ispitivanih gena i ispitanica sa mutacijom. Obzirom da pri usporedbi dužine liječenja homozigota i heterozigota nema značajne razlike, možemo zaključiti da nije bitno je li ispitanica homozigot ili heterozigot, već prisustvo ili odsustvo dokazanih mutacija utječe na ishod liječenja metodama pomognute oplodnje.



### 4.3. Broj ciklusa MPO do začeća

Drugi ispitivani čimbenik je bio broj ciklusa medicinski pomognute oplodnje do začeća. Prikazane su zajedno sve korištene metode pomognute oplodnje, odnosno ukupni broj ciklusa liječenja, uključujući intrauterinu inseminaciju, *in vitro fertilizaciju* i prijenos odmrznutih zametaka. U ispitanica bez mutacije, prosječan broj ciklusa bio je 3.19 (SD± 1.37). U ispitanica koje su homozigoti za mutaciju prosječan broj zahvata bio je 4.18 (SD±1.68), dok je u ispitanica koje su heterozigoti prosječan broj zahvata bio 4.04 (SD±1.62).

Tablica 2. Broj ciklusa MPO do začeća

	Prosječan broj ciklusa SV ± SD	Varijanca	p
<b>Ispitanice bez mutacije</b>			
(N=379)	3.19±1.37	4.11	
<b>Homozigoti</b>			
(N=60)	4.18±1.68	8.88	0.002*
<b>Heterozigoti</b>			
(N=54)	4.04±1.62	8.74	0.02*

\*p < 0,05 – statistički značajno, homozigoti i heterozigoti se ne razlikuju značajno

SV=srednja vrijednost, SD= standardna devijacija

Usporedbom ukupnog broja postupaka MPO do začeća trudnoće u ispitanica bez mutacija i homozigota, ukazuje da su homozigotne mutacije povezane sa značajno dužim razdobljem liječenja neplodnosti postupcima MPO (p=0.002). Slično tomu, ispitanice sa heterozigotnim mutacijama gena imaju značajno duže vrijeme liječenja postupcima MPO u odnosu na

ispitanice bez mutacija ( $p=0.02$ ). Razlika u dužini liječenja između homozigota i heterozigota nije dokazana ( $p=0.76$ , Tablica 2).

Postoji značajna razlika između ispitanica bez mutacije za jedan od ispitivanih gena i ispitanica sa mutacijom. Obzirom da pri usporedbi broja postupaka do začeca između homozigota i heterozigota nema značajne razlike, možemo zaključiti da nije bitno je li ispitanica homozigot ili heterozigot, već prisustvo ili odsustvo dokazanih mutacija utječe na ishod liječenja metodama pomognute oplodnje.

## 5. RASPRAVA

Glavni rezultat ovog istraživanja ukazuje da prisutnost mutacija čimbenika koagulacije, značajno doprinosi produženom liječenju postupcima MPO, dok vrsta mutacije (homozigotna ili heterozigotna) nema takav učinak. Obzirom da danas parovi sve kasnije planiraju potomstvo, postupci MPO su postali iznimno važan način liječenja neplodnosti u reprodukcijski starijih parova. Prema rezultatima istraživanja, testiranje na mutacije čimbenika koagulacije bi moglo biti koristan korak pri dijagnostici i donošenju odluke o terapiji neplodnosti. Ovo se posebice odnosi na parove kod kojih je prisutna neplodnost neobjašnjelog uzroka koja bi se mogla povezati s mutacijom čimbenika koagulacije. Također, testiranje bi moglo biti od koristi u parova koji imaju veći broj neuspješnih postupaka MPO. U žena sa dokazanom mutacijom čimbenika zgrušavanja i u kojih je prisutna neplodnost neobjašnjelog uzroka ili veći broj neuspješnih ciklusa MPO, neki predlažu terapiju heparinom, koja bi mogla biti dodatno liječenje uz postupke MPO. Dokazano je da heparin ima pozitivno djelovanje na implantacijski proces i na receptivnost endometrija (13). Premda su potrebna daljnja istraživanja, terapija heparinom bi mogla pomoći u liječenju neplodnosti i povećanju uspješnosti MPO. Kako je ranije navedeno, postoje istraživanja koja govore u prilog povezanosti mutacija čimbenika zgrušavanja i neuspješnih MPO i istraživanja koja isto opovrgavaju. Prema objavljenoj analizi (23) koja je obuhvatila sedam znanstvenih članaka, uspješnost liječenja IVF metodom nije povezana sa mutacijama MTHFR, kao niti sa ostalim ispitanim čimbenicima (FVL, protrombin i rezistencija na aktivirani protein C). Nadalje, analiza uključenih „case-control“ studija je pokazala da ne postoji povezanost između mutacija MTHFR i uspješnosti liječenja MPO (24). Međutim, dokazana je povezanost FVL i uspješnosti MPO, dakle prisutnost FVL mutacije dovodi do slabijih rezultata liječenja MPO. Međutim, prospektivne kohortne studije koje su obrađene u meta-analizi nisu pokazale povezanost nijednog čimbenika zgrušavanja i učinkovitosti MPO.

Postoje istraživanja čiji su rezultati komplementarni sa rezultatima našeg istraživanja. Primjerice, studija koja je uspoređivala žene koje su imale 4 ili više neuspješna ciklusa IVF-ET i žene koje nisu imale problema sa začećem je pokazala povezanost između prisutnosti nasljednih trombofilija i smanjene uspješnosti metode IVF-ET (25). Ispitani su genetički čimbenici MTHFR, protrombin, FVL, antitrombin III, protein C i protein S. Naime, u skupini žena sa neuspješnim IVF-ET, u 42.9% dokazana je barem jedna od navedenih mutacija naspram u 18.2% zdravih žena [OR 2.9],  $p < 0.05$ . Sudeći po ovoj studiji, mutacije navedenih čimbenika dovode do gotovo tri puta slabijeg ishoda nakon postupka MPO.

„Case-control“ studija (26) je usporedila neplodne žene sa neuspješnim IVF-ET postupcima i zdrave žene koje su spontano začele. Prema ovom istraživanju mutacija barem jednog čimbenika zgrušavanja povećava rizik od neuspješnih postupaka MPO više od tri puta [OR=3.15]. Homozigotima za mutaciju MTHFR je dokazan 12 puta veći rizik od neuspješnog liječenja MPO [OR=12.33]. Također, dokazana je negativna povezanost mutacije FVL i uspješnosti MPO [OR=3.06], dok za ostale čimbenike povezanost nije dokazana.

Razultati prikazani u našem istraživanju potvrđuju povezanost mutacija gena sustava zgrušavanja krvi, te dužeg liječenja odnosno potrebe ponavljanja većeg broja postupaka MPO. U budućim istraživanjima bi moglo biti korisno ciljano odvojiti mutacije za MTHFR i mutacije za PAI-1, kako bi se istražilo u kojoj je mjeri određeni mutirani čimbenik povezan s povećanim brojem ciklusa MPO. Međutim, i bez navedene podjele je dokazali smo da postoji značajna povezanost. Obzirom da je jedna od mutacija dokazana kod gotovo četvrtine žena uključenih u naše istraživanje, smatramo da bi antikoagulantno liječenje, odnosno otkrivanje trombofilija bi moglo biti ključan korak u liječenju neplodnosti kod velikog broja parova. Najveći broj ispitanica uključenih u istraživanje je liječenje MPO uspješno završilo začećem nakon *in vitro* fertilizacije (56%), zatim nakon transfera odmrznutih zametaka (24%), i nakon intrauterine inseminacije (11%). Prema podacima Ministarstva zdravstva za 2017. godinu (27),

u Hrvatskoj se kao metoda MPO najviše koristio IVF/ICSI (61%), zatim IUI (21%) i FET (18%), što potrebuje velika novčana sredstva. Povećanjem učinkovitosti liječenja, odnosno skraćanjem vremena liječenja utječemo i na financijski aspekt liječenja neplodnosti, te su ovakva istraživanja zanimljiva zbog liječenih neplodnih parova prvenstveno, ali i zbog općeg društvenog interesa.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Dokazano je da uz mutaciju gena MTHFR i PAI-1 liječenje neplodnosti potrebuje značajno veći broj ciklusa MPO.
2. Isto tako, mutacije navedenih gena značajno su povezane sa dužim vremenom potrebnim za začeće.
3. Obzirom da su metode pomognute oplodnje novije medicinske metode liječenja, još uvijek postoje prijepori oko povezanosti mutacija genetičkih čimbenika koagulacije i učinkovitosti postupaka MPO.
4. Rezultati istraživanja bi mogli doprinositi liječenju parova s neplodnošću neobjašnjenog uzroka i parova s velikim brojem neuspješnih ciklusa MPO.
5. Antikoagulantno liječenje kao dodatno liječenje uz MPO bi moglo povećati vjerovatnost postizanja trudnoće, što je svakako cilj budućih istraživanja.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Neplodnost se definira kao nemogućnost začeća nakon 12 mjeseci redovitih spolnih odnosa bez zaštite. Još uvijek postoje brojne kontroverze oko povezanosti neplodnosti i nasljedne trombofilije nastale zbog mutacije čimbenika zgrušavanja krvi.

**Cilj:** Cilj istraživanja je bio utvrditi povezanost genskih mutacija čimbenika koagulacije u žena koje se liječe zbog neplodnosti i ishoda liječenja postupcima MPO.

**Ispitanici i postupci:** U istraživanje su uključene 493 žene koje su se liječile zbog neplodnosti na Zavodu za humanu reprodukciju Kliničkog bolničkog centra Rijeka i koje su nakon postupaka MPO začele trudnoću. Ispitanice su liječene intrauterinom inseminacijom, *in vitro fertilizacijom*, transferom odmrznutih zametaka i kombinacijom navedenih metoda. Ispitanice su testirane na mutacije čimbenika zgrušavanja krvi (plazminogen aktivator inhibitor-1, metilentetrahidrofolat reduktaza, faktor II, faktor V Leiden). U ukupno 114 ispitanica je dokazana mutacija gena (60 homozigota i 54 heterozigota). Za sve ispitanice je izračunato trajanje liječenja i broj ciklusa MPO do začeća.

**Rezultati:** U ispitanica homozigota i heterozigota za mutaciju čimbenika zgrušavanja potrebno je značajno više mjeseci liječenja do začeća nego kod ispitanica bez mutacije ( $p=0.0003$ , odnosno  $p=0.03$ ). Nije dokazana značajna razlika u dužini liječenja između homozigota i heterozigota. Slično tome, u ispitanica homozigota i heterozigota potrebno veći broj ciklusa MPO do začeća nego u ispitanica bez mutacije ( $p=0.002$ , odnosno  $p=0.02$ ). Nije dokazana značajna razlika broja ponavljanih postupaka MPO između homozigota i heterozigota.

**Zaključak:** Mutacija genskih čimbenika zgrušavanja krvi značajno je povezana s dužim liječenjem neplodnosti i potrebom ponavljanja ciklusa liječenja MPO. Prisustvo ili odsustvo mutacije značajno utječe na uspjeh liječenja, a ne vrsta mutacije.

**Ključne riječi:** neplodnost, metode pomognute oplodnje, nasljedna trombofilija

## **8. SUMMARY**

**Introduction:** Infertility is defined as a reduction or lack of ability to reproduce. There are still controversies regarding the importance of coagulation factors mutations in infertility.

**Aim:** Aim of this research was to examine the importance of coagulation factors mutations in patients with infertility.

**Materials and methods:** Research examined 493 female patients who underwent treatment for infertility on Department of human reproduction in Clinical Hospital Centre in Rijeka. The patients ended their treatment with total of 634 pregnancies. Therapy included intrauterine insemination, *in vitro fertilization*, frozen embryo transfer or the combination of mentioned methods. Research examined whether the patients had a mutation of coagulation factors (plasminogen activator inhibitor-1, methylenetetrahydrofolate reductase, factor II, factor V Leiden). 114 patients had diagnosed mutation, 60 of which were homozygotes and 54 were heterozygotes. For every patient duration of therapy on Department of human reproduction and number of times they underwent the therapy was examined.

**Results:** Research proved that both homozygotes and heterozygotes require longer time to pregnancy than patients without mutations ( $p=0.0003$  and  $p=0.03$ , respectively). There was no difference between homozygotes and heterozygotes. Similarly, both homozygotes and heterozygotes required more ART cycles before reaching pregnancy than patients without mutations ( $p=0.002$  and  $p=0.02$ , respectively). There was no difference between homozygotes and heterozygotes regarding number of cycles.

**Conclusion:** Presence of mutation of coagulation factors leads to prolonged ART treatment and more cycles needed to reach the pregnancy.

**Key words:** infertility, assisted reproduction therapy, inherited thrombophilia



## 9. LITERATURA

- (1) Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*. 2008;90(5):S60.
- (2) Šimunić V. Izvantjelesna oplodnja i druge metode pomognute oplodnje u čovjeka. U: Šimunić V, urednik. *Ginekologija*, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 2001. p 357-367
- (3) Zinaman M, Clegg E, Brown C, O'Connor J, Selevan S. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertility and Sterility*. 1996;65(3):503-509.
- (4) Mascarenhas M, Flaxman S, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens G. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Medicine*. 2012;9(12):e1001356.
- (5) WHO Technical Report Series. Recent Advances in Medically Assisted Conception Number 820, 1992, pp 1-111. 1992.
- (6) Augood C, Duckitt K, Templeton A. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 1998;13(6):1532-1539.
- (7) Gaskins A, Rich-Edwards J, Missmer S, Rosner B, Chavarro J. Association of Fecundity With Changes in Adult Female Weight. *Obstetrics & Gynecology*. 2015;126(4):850-858.
- (8) Pasquali R, Gambineri A. Metabolic effects of obesity on reproduction. *Reproductive BioMedicine Online*. 2006;12(5):542-551.
- (9) Rossi B, Berry K, Hornstein M, Cramer D, Ehrlich S, Missmer S. Effect of Alcohol Consumption on In Vitro Fertilization. *Obstetrics & Gynecology*. 2011;117(1):136-142.

- (10) Lyngsø J, Kesmodel U, Bay B, Ingerslev H, Nybo Andersen A, Ramlau-Hansen C. Impact of female daily coffee consumption on successful fertility treatment: a Danish cohort study. *Fertility and Sterility*. 2019;112(1):120-129.e2.
- (11) Stevens S, Woller S, Bauer K, Kasthuri R, Cushman M, Streiff M, Lim W, Douketis J. Guidance for the evaluation and treatment of hereditary and acquired thrombophilia. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2016;41(1):154-164.
- (12) Zupančić Šalek S. Poremećaji hemostaze. U: Vrhovac B. *Interna medicina*. 4. izdanje. Zagreb: Ljevak, 2008. p 962-972
- (13) Ata B, Urman B. Thrombophilia and assisted reproduction technology—any detrimental impact or unnecessary overuse?. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016;33(10):1305-1310.
- (14) Kydonopolou K, Delkos D, Rouso D, Ilonidis G, Mandala E. Association of plasminogen activator inhibitor-type 1 (PAI-1)- 675 4G/5G polymorphism with unexplained female infertility. *Hippokratia*. 2017; 21(4):180-185.
- (15) Hull M, Glazener C, Kelly N, Conway D, Foster P, Hinton R, Coulson C, Lambert P, Watt E, Desai K. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *BMJ*. 1985;291(6510):1693-1697.
- (16) Haagen E, Hermens R, Nelen W, Braat D, Grol R, Kremer J. Subfertility guidelines in Europe: the quantity and quality of intrauterine insemination guidelines. *Human Reproduction*. 2006;21(8):2103-2109.
- (17) Khalife D, Nassar A, Khalil A, Awwad J, Abu Musa A, Hannoun A, El Taha L, Khalifeh F, Abiad M, Ghazeri G. Cumulative Live-Birth Rates by Maternal Age after One or Multiple

*In vitro* Fertilization Cycles: An Institutional Experience. International Journal of Fertility and Sterility. 2020;14(1):34-40.

(18) Rafei H, Eissa H, Amin S, Ramzy A, Mobarek D. Prevalence of Inherited and Acquired Thrombophilia in Females Post Multiple Assisted Reproductive Technology (ART) Attempts. Blood. 2016;128(22):3535-3535.

(19) Behjati R, Modarressi M, Jeddi-Tehrani M, Dokoohaki P, Ghasemi J, Zarnani A, Aarabi M, Memariani T, Ghaffari M, Akhondi M. Thrombophilic mutations in Iranian patients with infertility and recurrent spontaneous abortion. Annals of Hematology. 2006;85(4):268-271.

(20) Bubalo P, Buterin I, Šalek Z, Đogić V, Zupančić-Šalek S. Association of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Polymorphisms and Methylene Tetrahydrofolate Reductase Polymorphisms with Spontaneous Miscarriages. Acta Haematologica. 2017;138(2):111-115.

(21) Göpel W, Ludwig M, Junge A, Kohlmann T, Diedrich K, Möller J. Selection pressure for the factor-V-Leiden mutation and embryo implantation. The Lancet. 2001;358(9289):1238-1239..

(22) van Dunné F, de Craen A, Heijmans B, Helmerhorst F, Westendorp R. Gender-specific association of the factor V Leiden mutation with fertility and fecundity in a historic cohort. The Leiden 85-Plus Study. Human Reproduction. 2006;21(4):967-971.

(23) Tan X, Yu Z, Sao J, Chen L, Shen Y, Ding J, Shi W. Association between in vitro fertilization outcomes and inherited thrombophilias: a meta-analysis. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2016;33(8):1093-1098.

(24) Di Nisio M, Rutjes A, Ferrante N, Tiboni G, Cuccurullo F, Porreca E. Thrombophilia and outcomes of assisted reproduction technologies: a systematic review and meta-analysis. Blood. 2011;118(10):2670-2678.

(25) Azem F. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. *Human Reproduction*. 2004;19(2):368-370.

(26) Safdarian L, Najmi Z, Aleyasin A, Aghahosseini M, Rashidi M, Asadollah S. Recurrent IVF failure and hereditary thrombophilia. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2014; 12(7):467-470.

(27) Zdravlje.gov.hr[Internet]. Zagreb: Godišnje izvješće o MPO metodama za 2017.godinu. [ažurirano 8.1.2020.; citirano 11.6.2020.]. Dostupno na: <https://zdravlje.gov.hr/>

## 10. ŽIVOTOPIS

Toni Jurić je rođen 14.11.1993. u Splitu, gdje je završio osnovnu i srednju školu. Integrirani preddiplomski i diplomski studij Medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci upisuje u akademskoj godini 2014./2015.

Tijekom studija je aktivni član Međunarodne udruge studenata medicine CroMSIC gdje obavlja dužnost Nacionalnog dužnosnika za javno zdravstvo i sudjeluje u organizaciji javnozdravstvenih akcija i projekata. Od 2018.godine je zamjenik člana Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta.

Za vrijeme trajanja studija sudjeluje u istraživanjima nealkoholne masne bolesti jetre (NAFLD) i u radu NAFLD ambulante pod mentorstvom doc.dr.sc. Ivane Mikolašević, dr.med. Sudjeluje u organizaciji studentskih kongresa na Medicinskom fakultetu u Rijeci i u organizaciji European Conference of Young Gastroenterologists (ECYG) u Zagrebu 2018. godine. Aktivno sudjeluje na znanstvenim skupovima i kongresima u Hrvatskoj i inozemstvu.

Aktivno se služi engleskim, a pasivno njemačkim jezikom.