



УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ ВО ШТИП

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ
БАЗИЧНИ И КЛИНИЧКИ ИСТРАЖУВАЊА ВО МЕДИЦИНАТА

м-р. д-р Снежана Стојковска

„Резултати од ин витро оплодување кај пациентки со намалени оваријални резерви по интраоваријална апликација на автологна плазма збогатена со тромбоцити, активирана со калциум глуконат: плазма збогатена со тромбоцити перспективна терапија во иднина”

- докторски труд -

Ментор

проф. д-р Глигор Димитров

Екстерен ментор

проф. д-р Славејко Сапунов

Штип, 2020

Содржина	2
Резиме	4
Abstract	6
Употребувани кратенки	8
1. Вовед	9
➤ 1.1 Дефиниција за оваријален инфертилитет асоциран со намалени оваријални резерви.....	9
➤ 1.2 Критериуми за дефинирање на пациентки со намалени оваријални резерви (PORs).....	10
➤ 1.3 Клеточни и молекуларни аспекти на оваријално стареење.....	13
➤ 1.4 Оваријално подмладување (рејувенација) низ историјата.....	18
➤ 1.5 Нов метод во третман на оваријален инфертилитет со плазма збогатена со тромбоцити (PRP).....	20
➤ 1.6 Класификација на PRP	22
➤ 1.7 Употребата на PRP.....	22
➤ 1.8 Автологна PRP како потенцијален терапевски метод за оваријална регенерација со реактивација на оваријална фоликулогенеза.....	23
➤ 1.9 Паракриниот ефект од PRP врз различните таргет клеточни фенотипови	24
2. Цели и предмет на истражувањето	27
➤ 2.1 Цел.....	28
➤ 2.2. Работна хипотеза.....	28
3. Материјали и методи	29
➤ 3.1 Дизајн на студијата.....	29
➤ 3.2 Критериуми за вклучување и исклучување во студијата.....	30
➤ 3.3 Метода - трансвагинална интраоваријална интракортикална апликација на автологна плазма збогатена со тромбоцити.....	31
➤ 3.4 Протокол на работа	31
3.4.1 Начин на подготовка на автологна плазма збогатена со тромбоцити	31
3.4.2 Подготовка на пациентки за постапка на ин витро фертилизација.....	32
3.4.3 Интрацитоплазматично внесување на сперматозоид – ICSI (ang. Intracytoplasmic sperm injection) и евалуација на бластомери.....	33
3.4.4 Ембриотрансфер.....	43
3.4.5 Потврда на бременост.....	23
4. Статистичка обработка на податоци	35
5. Резултати	37

➤ 5.1 Базичните карактеристики на група А.....	37
➤ 5.2 Разлики во базичните карактеристики помеѓу групите А и В	40
➤ 5.3 Обработка на плазма.....	43
➤ 5.4 Дескриптивна статистика на параметри на оваријална стимулација / разлика помеѓу групите А и В.....	44
➤ 5.5 Дескриптивна статистика на параметри за следење на успехот од ин витро фертилизација/ разлика помеѓу групите А и В.....	48
➤ 5.6 Промени на оваријалните хормонални и функционални маркери во групата А по интраваријална интракортикална апликација на PRP	53
➤ 5.7 Корелација.....	55
➤ 5.8 Разлика на оваријалните хормонални и функционални маркери пред и по интраоваријална интракортикална апликација на PRP.....	57
➤ 5.9 Корелација/број на тромбоцити (PRP)	60
6. Дискусија.....	63
7. Заклучок.....	69
8. Ограничување	68
9. Имплементација во практика.....	70
10. Преглед на литературата (REFERENCES).....	78

„Резултати од ин витро оплодување кај пациентки со намалени оваријални резерви по интраоваријална апликација на автологна плазма збогатена со тромбоцити, активирана со калциум глуконат: плазма збогатена со тромбоцити перспективна терапија во иднина”

РЕЗИМЕ

Во денешното современо општество третманот на пациентки со намалени оваријални резерви претставува медицински предизвик и е од големо клиничко значење. Со употребата на плазма збогатена со тромбоцити (PRP) како нова метода кај оваа група пациенти се зголемува стапката на клиничка бременост и стапката на живородени деца во текот на ин витро постапка. Зголемената употреба на PRP во поголем број ин витро центри низ светот, како и објавувањето на првото позитивно искуство во ин витро фертилизација ја наметна потребата од евалуација на оваа метода. Целта на оваа судија е да се утврди дали интраоваријалната апликација на автологната плазма збогатена со тромбоцити (PRP) кај пациентки со намалени оваријални резерви (PORs) може да влијае врз параметрите што го дефинираат успехот од ин витро фертилизација (ИВФ). Акцент е ставен на позитивните ефекти од употребата на ПАП врз објективна промена на биомаркерите за процена на оваријалните резерви.

Оваа студија опфати 60 пациентки што се јавиле на одделот за ин витро фертилизација, при ПЗУ Ремедика, Скопје, во периодот од 2017 до 2018 година. Пациентите вклучени во студијата мораа да исполнуваат најмалку два од наведените три Болоњски критериуми објавени од страна на Европското здружение за репродуктивна медицина и ембриологија во 2011: напредната возраст на мајката, претходен лош или неадекватен одговор на оваријална стимулација или абнормален тест за оваријални резерви. Пациентките се запознаени со студијата, информирани за текот на постапката и од сите е добиена писмена согласност за истата. Двете групи се избалансирани во поглед на возраста, BMI, хормонален статус, вкупен број антрални фоликули, претходни ИВФ-обиди и времетраење на инфертилитет. PRP е подготвен според упатствата на производителот Regen ACR®-C. Кај испитуваната група (30) приближно 3-5 ml од автологната плазма под ултразвучна контрола, трансвагинално се инјектира интракортикално во ткивото на јајчникот пред да се започне со постапката за ИВФ. Контролната група (30) се пациентки каде што не е направен третман со PRP. Пациентките се стимулирани според препораките зададени од Американското здружение за репродуктивна медицина. Краток протокол со блага стимулација која вклучува 100-мг/ден

кломифен цитрат од 2. до 6. ден од менструален циклус, со или без дополнителна употреба на гонадотропин ≤ 150 IU/d и антагонист (цетротиде 0,25) кога дијаметарот на фоликулот е ≥ 14 mm. Кај сите пациентки е употребена ICSI како метода за оплодување на јајце-клетка. Серумската концентрација на FSH, LH, естрадиол и AMH е утврдена пред и по третманот, со цел објективно да се следат промените на овие оваријални маркери. Во испитуваната група нивото на AMH во серумот е статистички сигнификантно зголемено по употребата на PRP, $p < 0,05$ ($p = 0,02$), а нивото на FSH сигнификантно намалено, $p < 0,01$ ($p = 0,003$) во испитуваната група. Во нашата студија забележавме и значително зголемен број на антрални фоликули по примената на PRP, $p < 0,001$ ($p = 0,0007$). Успехот од ИВФ кај пациентки претходно третирани со PRP се демонстрира преку фертилизациона стапка $80,67 \pm 25,42$, стапките на имплантација $33,33 \pm 44,99$, стапка на клиничка бременост $33,33 \pm 44,99$ и стапката на живороденост $40,00 \pm 50,71$. Иако покажа тенденција на пораст на сите параметри во испитуваната група, таа сепак не достигна значајна статистичка разлика во однос на контролната група.

Земајќи ги предвид тековните расположливи докази, можеме да заклучиме дека методата PRP објективно има потенцијал да ја регенерира функцијата на ткивото на јајчникот и да ги зголеми шансите за клиничка бременост. Нашата студија ја поддржува теоријата за зголемување на бројот на преантрални фоликули, проследено со соодветно растење на фоликулите и намалување на фоликуларната атрезија. Преку употребата на PRP потенцијално се сугерира нов концепт на стареење на јајчниците. Со зголемување на стапката на клиничка бременост и стапката на живороденост, PRP станува потенцијален успешен третман кај пациентки со намалени оваријални резерви. Потребни се дополнителни клинички, мултицентрични, ИВФ истражувања на поголема популација за да се детерминираат егзактно карактеристиките на пациентките кои би имале бенефит од употребата на PRP и истовремено би се верификувале нашите резултати.

Главно ограничување е недостиг на доволен број претходни студии за употребата на PRP во лекување оваријален инфертилитет. Ограничувања што треба да се земат предвид се и големината на студијата, дизајнот, рандомизираност и сл.

клучни зборови: намалени оваријални резерви, плазма збогатена со тромбоцити (PRP), ин витро фертилизација (ИВФ).

"Outcome of in-vitro fertilisation in poor responders after intraovarian injection of autologous Platelet-Rich plasma, activated with calcium gluconate: Platelet-Rich plasma a new promising therapy in the future"

Abstract

In today's modern society, the treatment of patients with poor ovarian reserve presents a medical challenge with amplified clinical connotation. The use of platelet-rich plasma (PRP) is a new hope that improves pregnancy chances. Increased use of the PRP in a number of in vitro centers around the world, as well as publication of a first experience in vitro fertilization, entails the need for this study. The aim of our study was to evaluate whether autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) application in ovarian tissue in PORs may affect the In vitro fertilization (IVF)/ Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcome.

This study included 60 women who contacted the department of IVF, Remedika, Skopje in the period from 2017-2018. Patients were selected according to the ESHRE consensus on the definition of PORs, and at least two of the following three features were present: advanced maternal age, a previous poor ovarian response or an abnormal ovarian reserve test. In both compared groups, there wasn't a statistically significant difference in regard to age, BMI, hormonal status, number of antral follicles, previous IVF attempts and duration of infertility. PRP was prepared by Regen ACR®-C Kit according to the manufacturer's guidelines. The first group consisted of 30 patients, who received approximately 3-5 ml of the PRP injected in the ovarian cortex using transvaginal ultrasound guidance. The control group included 30 patients with no intervention. The serum concentration of FSH, LH, estradiol and AMH were determined before the treatment and after the treatment in order to monitor ovarian function. The ovarian stimulation was performed according to the recommendations of the Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine by use mild protocol for ovarian stimulation. The protocol used 100-mg/day clomiphene citrate on day 2-5 of the cycle, adding the gonadotropin ($\leq 150\text{IU/d}$) and an antagonist (Cetrotide 0.25) when a lead follicle was $\geq 14\text{mm}$. In all participants, ICSI was used.

After treatment with PRP, AMH level in serum was significantly increased, $p < 0,05$ ($p = 0,02$), and FSH level was significantly decreased, $p < 0,01$ ($p = 0,003$). In our study we also noticed a significantly increased number of antral follicles after applying the PRP, $p < 0,001$ ($p = 0,0007$). IVF outcomes in the PORs after treatment with PRP were fertilization rates $80,67 \pm 25,42$, implantation rates $33,33 \pm 44,99$, clinical pregnancy rates $33,33 \pm 44,99$ and live birth rate $40,00 \pm 50,71$. Although it tends to increase, it did not show a significant

statistical difference with the control group.

Taking the current available proof and evidence into consideration, we can conclude that the PRP method objectively has the potential of recovering ovarian function and increases the chances of a clinical pregnancy. Our study supports the theory of increasing the number of preantral follicles, followed with appropriate follicular growth and reduction of follicular atresia. Improving the quantity and quality of oocytes / embryos with PRP potentially suggests a new concept of ovarian aging. Increasing the chances of clinical pregnancy in PORs, the PRP, can represent a new beneficial method in the treatment of patients with low ovarian reserve. Further research is needed to elucidate the predictive characteristics of patients likely to benefit from this intervention.

keywords: low ovarian reserve, Platelet-Rich Plasma (PRP), IVF.

Листа со кратенки

PORs (анг. poor ovarian responders) - пациентки со неадекватен (лош) одговор на оваријална стимулација

PRP (анг. Platelet Rich Plasma) - плазма збогатена со тромбоцити од

AFC (анг. Antral Follicle Count) - антралните фоликули

AMH (анг. Anti Mullerian Hormone) - антимилеров хормон

ИВФ - ин витро фертилизација

PRP - плазма збогатена со тромбоцити

BMI (анг. Body mass index) - индекс на телесна маса

LH - лутеинизирачки хормон

hCG (анг. Human Chorionic Gonadotropin Hormone) - хуман хорионски гонадотропин

GH - хормонот за раст

OSCs - оваријални стем клетки

FSH - фоликуло-стимулирачки хормон

PDGFs (анг. platelet-derived growth factors) - фактори на раст присутни во тромбоцитите

TGF beta (transforming growth factor beta family) - трансформирачкиот фактор на раст од бета-фамилија

VEGF - васкуларен ендотелијален фактор на раст

IGF - фактор на раст сличен на инсулин

DHEA - дехидроепиандростендион

1. ВОВЕД

1.1 Дефиниција на оваријален инфертилитет асоциран со намалени оваријални резерви

Инфертилитет се дефинира како неможност за спонтано забременување при редовни незаштитени сексуални односи во период од една година (за пациентки под 35-годишна возраст) или во период од 6 месеци (за пациентки над 35-годишна возраст). Инциденцата е 15-17% од паровите во репродуктивна возраст. Можноста за забременување на еден пар е 20-25% секој месец или 85% за период од една година, или 95% за период од две години (1).

Фертилноста кај еден пар во текот на последните десетлетија со следење на трендот на модерното општество доживува големи осцилации како последица на промена на улогата на жената, одложувањето на бременоста, зголемената употреба на контрацепција, легализирањето на абортусот, сексуално преносливите инфекции, економските услови и факторите на животната средина (изложеноста на одредени токсини) кои се појавуваат како важни дополнителни фактори (2).

Во одредени случаи, иследувањето и третманот кај паровите се и индивидуални во зависност од претходната медицинска историја, возраста, позната причина која може да влијае врз фертилноста, претходни пелвични инфламаторни заболувања, дијагностициран карцином и сл. (3,4).

Како најчеста причина за женски инфертилитет во 27% се јавуваат нарушувањата на овулацијата. Ова може да се должи на дисбаланс на лутеинизирачки хормон (LH) и фоликул-стимулирачки хормон (FSH), повреда или тумори на хипоталамус или хипофиза, премногу мала или прекумерна телесна тежина. Дополнителни состојби кои можат да влијаат врз хормоналниот дисбаланс и со тоа врз плодноста вклучуваат проблеми со тироидната жлезда, дијабетес, Кушингов синдром, синдром на полицистични јајници, предвремена оваријална инсуфициенција и др.

Одложувањето на бременоста и напреднатата возраст на мајката при прва бременост значително придонесуваат за зголемување на женскиот инфертилитет асоциран со возраста, а со тоа расте и зголемената потреба од одредени методи на асистирани репродукција (5).

Репродуктивното стареење е континуиран процес кој започнува пред раѓање и продолжува сè до менопауза (6). Жената се раѓа со одреден број герминативни клетки кои интраутерино околу 20. гестациска

недела на фетусот достигнуваат вредност од 6-7 милиони. Започнувајќи интраутерино, па понатаму во текот на целиот репродуктивен живот, овој број на герминативни клетки неповратно се намалува (7). Ова се должи на почетокот на овулација во репродуктивниот период, но и како резултат на зголемената стапка на фоликуларна атрезија во текот на целиот репродуктивен период (8).

Со тоа, фертилниот потенцијал започнува експоненцијално да се намалува во доцните 30-ти години и завршува во менопауза на просечна возраст од 50 год.(1). Токму поради тоа, возраста како независен параметар има значајно влијание и врз успехот на техниките за асистирани репродукција. Според една ИВФ-студија која опфаќа повеќе од 120 000 ИВФ-постапки, стапката на живороденост од 42,3% кај пациентки под 35-годишна возраст значително се намалува на само 15% кај жени на 41-42 години, за кај пациентки над 42 години да изнесува само 5% (9).

Во нашата студија главен акцент е ставен на третманот на пациентки со намалени оваријални резерви, односно пациентки што имаат слаб или неадекватен одговор на стандардниот конвенционален третман на оваријална стимулација во тек на ИВФ-процес (PORs).

Со терминот намалени оваријални резерви се дефинира квантитативно и квалитативно намалување на оваријалните примордијални фоликули кај жени во репродуктивна возраст. Со намалување на оваријалните резерви се намалува и фертилниот потенцијал на жената. Како состојба може да се појави кај жени во понапредна возрасна група, но и кај млади жени поради разни етиолошки фактори (10).

Третманот на пациентки со намалени оваријални резерви претставува медицински предизвик од големо клиничко значење и е предмет на многу студии во последните две децении.

1.2 Критериуми за дефинирање на пациентки со намалени оваријални резерви (PORs)

Првиот систематски преглед со кој се дефинираат жените со неадекватен одговор на ткивото на јајчникот при конвенционална стимулација во тек на ИВФ-процесот е направен од страна на Европското здружение за хумана репродукција и ембриологија (ESHRE) во 2011 и е објавен во таканаречените Болоњски критериуми (11).

Главната цел е да се отвори патот за формулирање ефикасни и

соодветни протоколи или модалитети за лекување на оваа група жени кои се подложени на третман со ИВФ-ЕТ врз основа на докази.

Во однос на терминологијата, донесен е заклучок за употребата на од англ. *poor ovarian responders (PORs)* како најадекватен термин со кој се објаснува слабиот, лош, неадекватен, сиромашен одговор на јајчникот при оваријална стимулација во текот на една постапка за ИВФ.

За да се дефинира PORs, мора да бидат присутни најмалку два од следниве три критериуми:

- (1) напредна возраст на мајката (> 40 години) или кој било друг фактор на ризик што може да доведе до PORs;
- (2) претходен PORs (≤ 3 ооцити со конвенционален протокол за стимулирање);
- (3) абнормален тест за оваријална резерва, т.е. Антрален фоликуларен број (AFC) помалку од 5-7 фоликули или антимицеров хормон (AMH) под 0,5-1,1 ng/ml.

PORs е прифатен како термин преку кој се детектираат намалени оваријални резерви и рано оваријално стареење.

Од 2011 година во неколку наврати се објавени дополнувања и ревизии на постојната класификација (12,13). Имено, овие критериуми беа критикувани главно поради разновидноста на етиолошките фактори што можат да влијаат врз оваријалните резерви, како што се карлична инфекција, ендометриом, претходни операции на јајниците и сл., особено зашто влијанието на секој од овие фактори врз резервите на јајниците е многу варијабилно. Се смета дека ваквите етиолошки фактори доведуваат до нарушување на интрафоликуларната ендокрина функција, како и нарушување на останатите регулаторни механизми, намалена активност на ароматазата, намалена биолошка активност кон гонадотропин и нарушувања во фоликуларната васкуларизација (14,15). Дебелината и хроничното пушење се други дополнителни фактори за кои се знае дека се поврзани со PORs (16). Изменетата експресија на одредени гени во кумулусот и гранулоза клетки се смета дека има клучна улога во етиологијата на PORs кај млади жени. Мутации, полиморфизми и алтернативно варијанти во FSH рецепторите имаат различни ефекти врз функцијата на истите. Одредени видови мутации во генот FMR1 се знае дека се поврзани со намалена функционална резерва на јајниците кај млади жени (17).

Како и да е, бидејќи одредена хетерогеност во однос на некои биолошки и клинички карактеристики кај пациенти вклучени во дефиницијата на PORs сè уште опстојува, предложена е нова класификација стратификувана во подгрупи или POSEIDON

класификација, со цел да се постигне подобрување на перформансите на приспособени терапии за овие пациенти и да се идентификуваат повеќе хомогени популации за да бидат вклучени во идните клинички испитувања (18).

Бидејќи консензусот на ESHRE е признаен како најважен кон униформна дефиниција на PORs и неговите критериуми се користат во секое рандомизирано контролирано испитување што вклучува стратегии за третман за PORs, истите критериуми се запазени во текот на правилната селекција на пациентките за овој докторски труд (11).

Бројот на антралните фоликули од англ. Antral Follicle Count (AFC) и антимилов хормон од англ. Anti Mullerian Hormone (AMH) денес се сметаат за најинформативни биомаркери за испитување на резервите на јајчникот (19). Иако сè уште е дискутабилно кој од двата биомаркери е супериорен во оцената на резервите на јајниците, и двата посочуваат на можен слаб и неадекватен одговор со можност за откажување на циклусот на ин витро фертилизација (ИВФ), како и да сигнализираат можност од прекумерниот одговор на оваријална стимулација со развојот на синдромот на оваријална хиперстимулација со еквивалентно ниво на точност и клиничка вредност (20,21).

Меѓу другото, поголем број студии покажале и на одредена поврзаност помеѓу концентрацијата на фоликуларниот AMH и стапката на имплантација на ембриони при ин витро постапка (22). AMH може да се смета како показател на плодноста кај жените во доцната репродуктивна возраст и стапката на успешност на циклусите на асистирани репродуктивна технологија. AMH може силно да предвиди слаб одговор при контролирана стимулација на јајниците (23).

Употребата на AFC и AMH дава охрабрувачки резултати во оптимизирање на третманот и подобрување на резултатите од асистирани репродукција. Од тие причини, истите претставуваат дел од третиот критериум во болоњската дефиниција на PORs. Сепак, и биомаркерите сè уште немаат целосна конзистентност. За AFC, избраните вредности се движат од помалку од 5 до помалку од 7, додека за AMH вредностите биле во опсег од помалку од 0,5 до помалку од 1,1 ng/mL. Неколку методолошки прашања се покренати во врска со дефинирањето на бројот на сонографскиот антрален фоликул (2-5 или 2-10 mm) и различни AMH анализи (лаборатории за Immunotech-Beckman Coulter и други дијагностички системи). Поголем предизвик е фактот што дијагностичките перформанси на кои било биомаркери на резервите на јајниците, вклучувајќи ги и овие две, се методолошки зависни од преваленцата на PORs кај проучуваната популација. Вториот може да

влијае врз чувствителноста и специфичноста на кој било тест за откривање на PORs, за возврат диктирајќи го избраниот праг. Очигледно изборот на пациентот е од клучно значење при проучувањето на PORs.

Оригиналните Болоњски критериуми не се осврнаа на прашањето за квалитетот на ооцитот. Хронолошката старост се смета за најдобар критериум на располагање, иако ограничен, за да се предвиди квалитетот на ооцитите и стапката на живороденост при процес на ИВФ (24,25). Но и покрај тоа, се чини дека додавањето на тестовите за оваријални резерви не влијае врз вредноста што ја носи хронолошката возраст сама по себе (20).

Во последните неколку години добро изведени студии покажаа значајна корелација помеѓу АМН и стапката на живороденост, независно од возраста. Сепак, нејзината предиктивна точност е лоша, особено кога постојат докази кои покажуваат дека живородените деца се можни со многу ниски нивоа на АМН кои се спротивставуваат на употребата на вредностите на АМН како клучни во одлуката за стимулација (26).

1.3 Клеточни и молекуларни аспекти на оваријалното стареење

Добро познат факт е дека репродуктивната способност кај една жена е тесно поврзана со нејзината возраст. Притоа клучната улога во репродуктивното стареење му се припишува на оваријалното ткиво. Овариумот е еден од првите органи во човечкото тело кој најрано покажува знаци за нарушување на неговата функција поврзана со стареење (27).

Старењето на оваријалното ткиво подразбира намалување на бројот на примордијалните оваријални фоликули следено со генерирање ооцити со намален фертилизационен потенцијал (28). Бројот на оваријални фоликули изнесува околу 7×10^6 за време на 4. месец од феталниот развој, каде што оогонијата се трансформира во примарна ооцита опкружена со еден слој на гранулозни клетки, формирајќи го на тој начин примордијалниот фоликул (29). Во нив ооцитата останува заробена во профаза од првата мејотична делба. Кај женско новороденче бројот на примордијални фоликули се намалува на 1×10^6 , за да достигне број од 300 000 за време на менарха.

Овие фоликули поминуваат низ различни степени на развој под влијание на интраоваријални регулаторни биомолекули и ендокрини фактори од оваријалната микросредина, како што се факторите на раст, цитокини, гонадални стероиди и др. (30). Притоа поголем број примордијални

фоликули во различен степен од нивната диференцијација доживуваат апоптоза, а само мал број фоликули достигнуваат овулација.

За да се справат со третманот на оваријална неплодност, истражувачите се соочуваат со проблемите наведени подолу, а кои се јавуваат кај возрасни (и фетални) јајчници. За време на фоликулогенезата кај јајчниците на една жена во репродуктивна возраст се следат и интерпретирани се следните состојби:

- присуство на геминативни адултни клетки кои се во мејоза I метафаза со хромозомски кросовер;
- присуство на герминативни адултни клетки диференцирани во мејоза I телофаза со цитокинеза;
- нивната миграција која е иницирана од CD14 и DR +MDCs, кои преку крвни венули од површината на јајчникот по васкуларен пат се водени до долната половина на оваријалниот кортекс;
- диференцијација и асоцијација на гранулозни клеточни гнезда со кортикални венули во долниот кортекс на јајчниците;
- присуство на циркулирачки ооцити со гранулозни клеточни гнезда кои формираат нови примарни фоликули;
- формирање примарни ооцити и секундарни Балбијани тела од гранулоза клетки, кои се потребни за функција на специфични органели потребни за раст и развој на ооцити со продолжување на мејоза I во мејоза II.

Отсуството на која било од овие фази, од кои некои бараат правилно функционирање на компонентите на имунолошкиот систем и вегетативната инервација, може да резултира со функционална неплодност, што би било тешко, па дури и невозможно, да се лекува со моментално достапни методи на ин витро матурација (IVM) и ин витро фертилизација (31).

Врз база на анализа на клеточното и молекуларно стареење на фоликулите утврдено е дека примордијалните фоликули можат да останат во стадиум на мирување од 10 до 50 години. Нивниот раст и правилен развој е тесно поврзан со оваријалната микросредина. Иако генерално е прифатено дека процесот на стареење е резултат од два фактори, вроден и надворешен (32). Најголем број теории го поврзуваат концептот на стареење со малфункција која настанува како резултат од физиолошка акумулација на иреверзибилно променети биомолекули како неизбежен дел од негативниот ефект на нормалниот метаболизам (33).

Оксидативен стрес се јавува како резултат на еден дисбаланс во производството на реактивни видови кислород и намалена способност на

ооцитите и гранулоза клетките да се елиминираат. Овие кислородни радикали преку нивната реакција со нуклеинските киселини, протеини и липиди претставуваат едни од најважните физиолошки индуктори на клеточните промени поврзани со стареење (34). Со самото тоа, тие се вклучени и во патогенезата на карциномот, кардиоваскуларните и невродегенеративните заболувања, како и стареењето на ткивото.

Оксидативниот стрес подразбира одредени клеточни и молекуларни промени на ооцитата и гранулоза клетките придружени со промени и во фоликуларната микросредина. Притоа голем број автори ја поврзуваат етиологијата на оксидативниот стрес со ефектот од стареење на оваријалната и фоликуларна васкуларизација. (35)

Најрелевантни сознанија за стареењето на оваријалниот фоликуларен базен, придружено со намалување на квантитетот и квалитетот на ооцитите, се добиени преку евалуација на матурни ооцити и гранулоза клетки добиени од перивулаторен фоликул при контролирана оваријална гонадотрописка стимулација. Истите покажале дека кај жени над 38 год. намалената продукција на стероиди и гликопротеини од страна на гранулоза клетките е истовремено проследена со зголемено ниво на оштетена митохондријална ДНК и секако намалено ниво на антиоксидантни ензими (36).

Клеточните промени подразбираат зголемена вакуолизација на цитоплазмата, митохондријални промени, дилатација на мазниот ендоплазматичен ретикулум и Голџи комплекс во ооцитите во примордијалните фоликули, како и намалување на бројот на митохондрии во гранулоза клетките. Овие морфолошки промени се случуваат со стареење на ткивото на јајчникот и се различни од оние поврзани со атрезија на фоликулите (37).

Притоа, во повеќе студии врз основа на набљудување на гранулоза клетките и зголемување на нивниот број кај транзиторни и примарни фоликули, многу автори забележале дека кај повозрасни жени фоликулите предвремено започнуваат со фазата на раст. Со тоа може да се објаснат одредени квалитативни и квантитативни аспекти на стареење на еден фоликул. Гранулоза клетките се едни од првите клетки што покажуваат промени при стареење на ткивото независно од питуитарната-гонадална оска. Имено, гранулоза клетките од растечките фоликули се главни во синтезата на антимицерин хормон (АМН), кој се смета за еден од ендокрините најсензитивни маркери за оваријалните резерви и почеток од оваријалното стареење (38), Меѓу другото, поголем број студии покажале и на одредена поврзаност помеѓу концентрацијата на фоликуларниот АМН и стапката на имплантација на ембриони при ин

витро постапка (39). АМН може да се смета како показател на плодноста кај жените во доцната репродуктивна возраст и стапката на успешност на циклусите на асистирани репродуктивна технологија. АМН може силно да предвиди слаб одговор при контролирана стимулација на јајниците (40).

Покрај гранулоза клетките, и самите ооцити се подложни на промени предизвикани со стареењето. Имено, некои од нив остануваат во стадиум на мирување и до 50 години пред да дојде до нивна понатамошна диференцијација и развој. Притоа голем број студии главната улога им ја препишуваат на митохондриите како најважна цитоплазматска органела. Митохондриите имаат клучна улога во клеточниот енергетски метаболизам, хомеостаза и смрт на клетката. Со тоа тие влијаат и врз неколку нивоа во процесот на создавање квалитет на ооцитите со одржан фертилен потенцијал (41). Улогата на митохондриите во понатамошната делба на јадрото е демонстрирана преку подобрување на фертилизациониот потенцијал кога митохондријално оштетени герминативни везикули (т.е. јадро на ооцит, кој е во профаза на мејоза I) се трансферирани во здрави оопласти (42).

Покрај горенаведеното, не помалку важно е и влијанието на фоликуларната микросредина во ооцитната диференцијација придружено со нуклеарни и цитоплазматични промени како значаен фактор поврзан со стареење. Првата хипотеза за влијанието на микросредината на Графовиот фоликул е поставена при испитувања кај пациентки со предвремена оваријална инсуфициенција каде што се утврдени промени на паракрини регулатори на фоликуларниот развој, како што се факторот за диференцијација на растот (GDF-9), протеин на коскената срцевина (BMP-15) и транскрипциониот фактор (FOX12) (43,44).

Сукисам е првиот што го тестираше потенцијалниот ефект на составот на фоликуларната течност како фактор на раст сличен на инсулин (IGF-II), врзувачки протеин IGFBP-3, IGFBP-4, BMP-15 лактоферин и АМН (45).

Голем број од овие фактори позитивно корелираат и со успешен ИВФ-исход и се предложени како маркери кои го одразуваат здравиот статус на ооцитата.

Промените во составот на фоликуларната микросредина се придружени со промени на перифоликуларната васкуларизација. Додека примордијалните и преантралните фоликули се снабдуваат со потребните елементи преку стромалните крвни садови, доминантниот фоликул кој расте зависи од перифоликуларната циркулација придружена со зголемена пролиферација на крвните садови (ангиогенеза) во тека клетките и зголемување на бројот на рецептори за серумскиот

гонадотропин (46).

Во некои студии е потврдено зголемено ниво на васкуларниот ендотелијален фактор на раст (VEGF) во фоликуларната течност кај постари ооцити (47). Тоа се објаснува преку намалена васкуларизација, придружено со хипооксија, што води до зголемена продукција на VEGF од страна на гранулоза и тека клетките со цел да се зголеми васкуларниот одговор и да се подобри перифоликуларната циркулација. Оксидативниот стрес води кон нарушување на клеточната функција, енергетскиот метаболизам, до ослободување на поголем број електрони, што може да влијае врз митохондријалната ДНК, нејзината структура и функција. Со нарушувањето на рамнотежата се ослободуваат цитохром С и други апоптоген фактори кои водат до апоптоза на клетката. Во исто време се активираат низа антиоксидативни ензими вклучувајќи ги цитоплазматската бакар/цинк супероксидна дисмутаза (Cu/ZnSOD) и митохондријалната Mn²⁺ зависна супероксидна дисмутаза (MnSOD), кои ги претвораат супероксидните анјони во водород пероксид, кој потоа се претвора во вода со помош на каталаза (CAT) и глутатион S-пероксидаза (GSSPx) (48).

Паралелно со иследување на оксидативниот стрес утврдено е намалување на неензимската антиоксидативна одбрана на клетката (како аскорбин, токоферол и сл.). Како и да е, нивната улога во оксидативниот стрес останува нејасна и контроверзна (49).

Поради тешкотии во создавањето идентични услови од оваријалната микросредина, многу процеси иследувани ин витро предизвикуваат дополнителни неразрешени прашања за кои се потребни дополнителни клинички и биолошки иследувања со цел да се развие превенција и одреден тераписки модус кај инфертилитетот асоциран со стареење на клетката.

1.4 Оваријално подмладување (рејувенација) низ историјата

Оогенезата или создавањето на јајце-клетката, ооцита, е еден сложен процес кој зависи од повеќе фактори. Тоа е најважна функција на оваријалното ткиво.

Долго време се веруваше дека жената е родена со одреден репродуктивен потенцијал кој е во директна зависност од бројот на примордијални фоликули создадени за време на ембрионалниот и фетален период и кој прогресивно се намалува за да достигне околу 300 000 примордијални фоликули за време на менарха.

Овие тврдења, благодарение на групата на Tilly, беа изменети

преку демонстрирање постоење на герминативни или оогонијални стем клетки во оваријалното ткиво (50).

Тоа доведува до развивање различни методи и техники преку кои научните кругови настојуваат да најдат соодветна метода која би била терапевска кај пациентки со оваријална инсуфициенција.

Кога би оделе низ историјата, првите истражувања водат кон почетоците на употребата на дехидроепиандростендион (DHEA) како додаток во исхраната што може да има терапевтски бенефит во третманот на пациентки со намалени оваријални резерви (51). Успехот на DHEA е клинички докажан во многу студии и останува еден од првите неинвазивни медицински третмани за подмладување на јајчниците. Употребата на прекурзори на тестостерон може да ја подобри оваријалната микросредина имајќи предвид дека нивото на DHEA постигнува пик помеѓу 20 и 30 години и се намалува апроксимативно по 2% годишно (52). Сличен концепт носи и употребата на коензим Q 10, за кој е утврдено дека има улога во подобрување на митохондријалната функција предизвикана од стареење на ткивото. Андрогените можат позитивно да влијаат и врз митохондријалната функција (53).

Хормонот за раст (GH) е уште една адјувантна терапија која се користи во комбинација со контролирана оваријална стимулација со цел да се зголеми бројот на добиени ооцити при ИВФ-постапка, како и да се зголемат стапките на клиничка бременост. Ограничените докази што вклучуваат мал број жени сугерираат дека GH како адјуванс може да биде од корист (54).

Други автори предлагаат трансвагинална траума на оваријалното ткиво, „pirsing“, како метод за подмладување на јајчниците. Корисниот одговор во оваријално ткиво на оваа горенаведена постапка е проследен со намалување на LH во хормоналниот профил, зголемување на протокот на крв во ткивата на јајчниците со приспособени промени на локален имунолошки одговор. На таков начин повреденото ткиво, исто така, почнува да создава фактори за раст кои го промовираат регенерирањето на ткивото (55).

Во интерес и проширување на сознанието на улогата на PRP во третман на оваријалната инсуфициенција од огромно значење е да се спомене и студијата на Bukovsky (31). Во оваа студија е посочена и потврдена улогата на циркулаторни моноклеарни антитела во реактивација на фоликулогенезата. Имено, оваријалните стем клетки од оваријалното ткиво се способни во одредени услови да се диференцираат во клетки со голема сличност како ооцитите (oocyte-like cells, OLCs), кои пак во ин витро услови не можат да постигната матурација и

фертилизација. Докажано е дека тоа се должи на отсуството на гранулоза клетки потребни за матурација на јајце-клетка, ооцит. Од друга страна, нивната интерација е тесно поврзана и со присуството на моноклеарни циркулирачки клетки. Тие влијаат врз индуцирање на одредени фази на мејозата во ооцитот. Затоа тука првпат се предлага употреба на моноклеарни клетки во оваријалната рејувенација, особено зашто имунолошкиот систем има соодветна улога во диференцирање на стем клетките. Надолнување на горенаведеното се и промените на имунолошкиот систем кои настануваат со стареење.

Во студијата, како третман за оваријална неплодност првпат се предлага користење на мала количина крв или плазма со моноклеарни клетки или сепарирани моноклеарни клетки од млади здрави плодни донаторки од иста етничка група. Циркулирачките моноклеарни клетки поврзани со имунолошкиот систем ја регулираат функцијата на речиси сите ткива во телото. Преносот на моноклеарни клетки преку замена на одреден волумен на крв од младата плодна жена може да предизвика привремено подмладување на ендокриниот и имунолошкиот систем, како и на оваријалното ткиво. Содржината на плазмата на имунолошките компоненти во крвта, на пример, антителата, може да ги елиминира евентуалните перзистирачки фоликули кои содржат стари ооцити непогодни за ИВФ. Спротивно на тоа, содржината на моноклеарни клетки може да предизвика фоликуларна реактивација која се состои од свежи автологни ооцити и гранулозни клетки.

Тоа доведе до студии каде што подобрувањето на клеточната функција на ооцитата следена преку нуклеарен трансфер во донор-ооците или цитоплазматски трансфер од донор-ооцита доведува до подобрување на квалитетот на ооцитата и нејзиниот фертилен потенцијал (three parents pregnancy), но остава отворени и неразрешени многу етички и социјални прашања (56).

Досегашните искуства покажаа дека не постои едноставен и успешен третман кој може да ја зголеми стапката на клиничка бременост и стапката на живороденост кај оваа група пациентки.

Ин витротото останува како најдобра cost-benefit опција која треба да се понуди како третман на избор. Дилемата останува во употребата на различни протоколи кај PORs, како протокол со антагонисти, протокол со агонисти, природен циклус на ИВФ, додавање мали дози на LH во рана фоликуларна фаза или лутелен почеток на FSH во регрутирање на фоликули. Досегашните студии не покажаа клинички бенефит и зголемена ефикасност на ниту еден од постојните протоколи за контролирана оваријална стимулација на пациентки со намалени оваријални резерви во

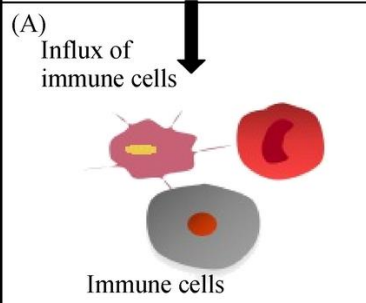
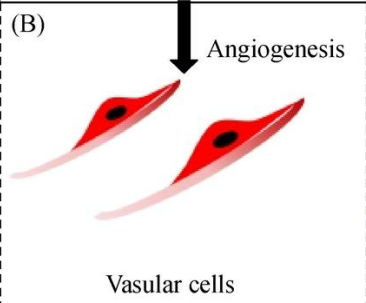
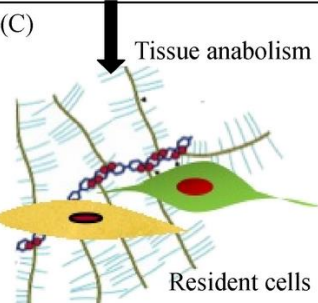
тек на ИВФ-постапка.

1.5 Нов метод во третман на оваријален инфертилитет со плазма збогатена со тромбоцити

Првиот опис на плазма збогатена со тромбоцити е воведен како термин за медицински предмет во 2007 година: „Препарат кој се состои од концентрирани тромбоцити во ограничен волумен на плазма. Тој се употребува при различни процедури за регенерација на хируршки ткива, каде што факторите на раст од тромбоцитите можат да влијаат врз забрзување на заздравувањето и регенерацијата на раните“.

Тромбоцитите се цитоплазматски фрагменти на мегакариоцитите, кои се формираат од коскената срцевина и со приближно 2 μm во дијаметар (57). Факторите на раст (GFs) содржани во алфа гранули од тромбоцити (50-80 по тромбоцит) се главен дел на PRP. Сепак, неодамнешните протеомични студии ја откриле сложеноста на биомолекулите во тромбоцити, која не ги вклучува само факторите на раст, туку и широк спектар на молекули, вклучувајќи цитокини, хемотаксини, атхезивни протеини, ензими, фибринолитички и антифибринолитички протеини. Имено, содржат повеќе од 30 биоактивни протеини, од кои повеќето имаат фундаментална улога во хемостаза или заздравување на ткивото (58). Неколку од нив (PGF, TGF, VEGF, EGF, FGF, CTGF, IGF-1) се фундаментални за заздравување на ткивото (таб.1).

Табела1. Состав на PRP, паракрин механизам на дејство и целни (таргет) клетки

NAP-2, MCP-1, RANTES, PF-4, IL-8, platelet microparticles	VEGF, ANGPT, HGF, PDGF bFGF, TSP-1, PF4, histamine	IGF, IGF-BP, TGF-b1, CTGF, MMPs, TIMPs
(A) Influx of immune cells  Immune cells	(B) Angiogenesis  Vascular cells	(C) Tissue anabolism  Resident cells
Monocyte/macrophage polarization Cytokine and chemokine production	Migration, proliferation and sprouting of endothelial cells	Stromal cell proliferation, cytokine production, extracellular matrix synthesis

Со дегранулација на алфа(α) гранулите, што подразбира нивна фузија со клеточната мембрана, се ослободуваат биоактивни молекули. Тие преку

соодветни трансмембрански рецептори во таргет клетките поттикнуваат цела низа интрацелуларни процеси кои доведуваат до пролиферација, диференцијација, формирање на матрикс, продукција на остеоид, синтеза на колаген и сето она што води кон обновување и регенерација на ткивото (58,59).

Активирањето на α -гранулите во тромбоцитите се постигнува преку одредени надворешни или внатрешни фактори. Се смета дека процесот на активирање на тромбоцитните α -гранули е еден од најважните чекори кој може да влијае врз достапноста на ослободените биомолекули, а со тоа и врз квалитетот на PRP (60). Како најчести активатори пред администрација на PRP во оштетеното ткиво се употребуваат тромбин и/или калциум глуконат (61). Секрецијата на активните биомолекули започнува 10 мин. по активација на тромбоцитите, а 95% од факторите на раст се ослободени во период од 1 час.

Начинот на добивање на PRP е едноставен, минимално инвазивен и со ниска цена. Висока концентрација на фактори на раст и цитокини во PRP во оштетеното ткиво влијаат врз постигнувањето рамнотежа меѓу анаболните и катаболните процеси, оптимизирајќи ја ткивната околина и фаворизирајќи го процесот на заздравување на ткивото.

1.6 Класификација на PRP

Според класификација предложена од Ehrenfest, дефинирани се 4 различни вида PRP во зависност од содржината на клетки и присуството на фибрин (62).

1. Чиста PRP или сиромашна со леукоцити PRP;
2. Леукоцитен тип на PRP (најголем број комерцијални и експериментални системи);
3. PRP богата со фибрин;
4. PRP богата со леукоцити и фибрин.

Оваа класификација е цитирана, публикувана и потврдена од страна на мултидисциплинарна конференција во 2012 г. (63).

Притоа центрифугата, број на вртежи, времето, температура, употребата на антикоагуланти и начинот на активација на PRP можат да влијаат врз приготвувањето и квалитетот на автологна PRP (64,65).

Dugrillon тврди дека бројот на фактори на раст не секогаш е во корелација со бројот на тромбоцитите. Неговата студија потврдува дека факторите на раст TGF- β 1 и концентрацијата на тромбоцити се

правопропорционални со силата на центрифугирање и бројот на вртежите. Со напомена дека TGF- β 1 некогаш е инверзно поврзан со центрифугалната сила над 800x g. Затоа и треба повеќе да се обрне внимание на концентрацијата на фактори на раст (квалитетот на PRP) отколку на концентрацијата на тромбоцитите (66).

Возраста, од друга страна, не дава сигнификантни промени во концентрацијата на тромбоцитите и факторите на раст, но хематокритот и вкупниот број на тромбоцити можат да влијаат врз концентрацијата на PRP (67).

Се смета дека процесот на активирање на тромбоцитните α -гранули е еден од најважните чекори што може да влијае врз достапноста на ослободените биомолекули, а со тоа и врз квалитетот на PRP (68). Како активатор пред администрација на PRP во нашата студија е користен калциум глуконат.

1.7 Употреба на PRP

Последниве години ефектот од плазма збогатена со тромбоцити сè повеќе се користи во третман на повреди на меките и сврзните ткива, како и во коскените графтови. Употребата на PRP доведува до забрзано заздравување на повреденото ткиво, ангиогенеза и ткивно ремоделирање, со што стана рутински третман во ортопедија, дерматологија и некои автоимуни болести (69,70). PRP покажа голем успех во лекување спортски повреди и нивно побрзо заздравување, како и за третман на изгореници. Имено, факторите на раст присутни во тромбоцитите и белите крвни клетки во момент на повреда на организмот се активираат со цел да дојде до природно обновување и регенерација на повредениот орган.

Притоа една од улогите на овие биоактиватори се должи на нивната интеракција со мезенхималните стем клетки. Всушност, овие молекули ја менуваат молекуларната микросредина и на тој начин можат да имаат влијание и врз активирањето на присутните мезенхимални матични клетки во ткивото преку нивна пролиферација, диференцијација, миграција, како и промени на имунолошкиот одговор на ткивото. Мезенхималните матични клетки се диференцираат во различни мезодермални клетки, вклучувајќи адипоцити, хондроцити и остеобласти (71,72).

1.8 Автологна PRP како потенцијален терапевски метод за оваријална регенерација со реактивација на оваријална фоликулогенеза

Оваријалното подмладување (рејувенација) е процедура со која автологна плазма богата со тромбоцити преку одреден медицински третман (лапароскопски или по пат на трансвагинална пункција) се аплицира во ткивото на јајчникот и овозможува реактивирање на фоликулогенеза, односно диференцијација на стем клетките и создавањето зрели јајце-клетки.

Првиот апстракт и устен извештај за PRP како метода за подмладување на јајниците кај пациенти беше објавен во 2017 година, во отсуство на писмен извештај на медицинска конференција (73). Следната година е објавена првата студија за интраоваријално инјектирање на автологна плазма богата со тромбоцити и ефектот на PRP врз оваријалната микросредина и производство на оцити со добар квалитет. Сепак, механизмот на дејствување сè уште не е разјаснет, а години може да поминат до имплементирање на клинички наоди во практика. Еден од начините на кои дејствува PRP е активирање на примарните фоликули преантрални во заедничка синергистична поврзаност преку факторите на раст содржани во PRP и употребата на гонадотропини, а вториот начин е создавање на „де ново,, оцити преку диференцијација на присутните оваријални герминативни стем клетки (74).

Како едно од можните објаснувања се наведува можноста за подобрување на фоликуларната микросредина. Имено, фоликулогенезата подразбира раст и развој на примордијалните фоликули, претставена преку неколку развојни фази кои завршуваат со ослободување на оцита способна за фертилизација и диференцирање на фоликулот во жолто тело. Притоа повеќе екстра и интраоваријални патишта ги контролираат растот на оцитот и диференцијацијата на соматски клетки на фоликулот. За одбележување се факторите на раст, особено transforming growth factor beta family (TGF beta), кои играат значајна улога за време на развојните фази на фоликулот (75). PRP содржи многу паракрини фактори кои влијаат врз фоликуларната микросредина придружена со промени на перифоликуларната васкуларизација. Додека примордијалните и преантрални фоликули се снабдуваат со потребните елементи преку стромалните крвни садови, доминантниот фоликул кој расте зависи од перифоликуларна циркулација преку ангиогенеза и зголемување на бројот на рецептори за серумските гонадотропини (42,43). Не помалку важен е и составот на фоликуларната

течноста, како и присуството на IGF-II, BMP-15, AMH и лактоферин, претходно споменати во делот за клеточни и молекуларни аспекти од клеточното стареење (45).

Од друга страна, не е исклучена активација на постнатална оогенеза преку стимулирање, пролиферација и диференцијација на оваријалните герминативни стем клетки.

1.9 Паракриниот ефект од PRP врз различните таргет клеточни фенотипови

Матичните клетки имаат централна улога во регенерација на ткивото поради три нивни најважни особини. Првата е нивниот потенцијал во диференцирање во одредени клеточни линии, втората е паракриниот ефект врз околните клетки и трета - нивната способност во моделирање на имунолошкиот одговор преку секреција на простагландини (76). Матичните клетки, поради нивната достапност, најмногу се изолирани од коскената срцевина, масното ткиво и периферна крв.

Ин виво активација на матичните (стем) клетки најчесто настанува под влијание на одредени молекуларни промени во нивната микрооколина. Во тој контекст во регенеративната медицина се направени повеќе иследувања кои настојуваат да ја поврзат употребата на PRP со мезенхималните стем клетки. Студиите се фокусирани на проширување на знаењето за тоа како влијае PRP, а и како го модифицира однесувањето на стем клетките.

Притоа се иследувани влијанието на PRP врз пролиферација, миграција, диференцијација на стем клетките, зачувување на нивните имуномодулаторни особини, како и појавата на фенотип на клетката поврзана со сенесценција (77). Од α -гранулите на тромбоцитите се ослободуваат неколку различни фактори на раст: PDGF, EGF, VEGF, ECGF, FGF, TGF IGF, кои имаат хемотаксично својство насочено кон мезенхималните стем клетки. Хемотаксичните својства на биомолекулите во PRP може делумно да се припишат и на хемокин SDF-1 α складиран во алфа-гранулите (78,79). Тоа доведува до регрутирање на стем клетките и соодветно нивна активација.

Зголемената миграцијата на стем клетките е од клучно значење за да се зголеми ефикасноста на разни техники во регенеративната медицина.

Матичните клетки го модифицираат и имунолошкиот одговор преку супресија на пролиферација на Т-лимфоцити, влијаат врз функцијата на Б-лимфоцити, НК-клетки и дендритични клетки (80). За одбележување е

дека супервисоката концентрација на тромбоцити (10x) влијае врз намалување на инхибиторниот ефект на стем клетките врз Т и НК-клетките проследено со зголемена секреција на IL-6, IL-8 и намалено ниво на простагландин PGE2 (81).

Денес постојат различни постапки за подготовка на PRP, различна технологија која може да влијае врз ефикасноста и квалитетот на PRP, а со тоа и врз мезенхималните стем клетки. Составот на PRP, соодносот на бројот на тромбоцитите и леукоцитите во одреден волумен на плазмата, начинот на активирање на PRP и на крај интериндивидуалната варијабилност се едни од важните фактори што можат да влијаат врз биолошкиот ефект што го покажува PRP врз ткивото (82).

За активација на мезенхималните стем клетки во клиничка практика се користи и PRP добиен од еден донатор или повеќе донатори. Во однос на донаторска PRP, клучен параметар што треба да се земе предвид е возраста на донорот, бидејќи значително влијае врз биолошката активност на PRP. На пример, пролиферацијата на стем клетките е повисока кај PRP од млади донатори, додека стем клетките култивирани со PRP од постарите донатори може да имаат намалена пролиферација, да покажат фенотип на стареење и со тоа да ја спречат способности за диференцијација на одредени клеточни линии (83).

Релевантноста на добиените податоци за добивање суштинско знаење за PRP и дизајнирање успешни терапии сè уште некомплетна. Тоа се должи на фактот дека молекуларниот базен ослободен од тромбоцитите е многу сложен, а експериментален дизајн за ин витро експерименти за постигнување значајни резултати сè уште е предизвик. Како надополнување на погоренаведеното се и првите студии направени во Јапонија и на Универзитетот „Стенфорд“ во Калифорнија, кои известуваат пред неколку години форма на подмладување на јајчниците, во која тие го отстрануваат оваријалното ткиво, кое потоа е третирано со одредени лабораториски биолошки активни состојки, пред да биде ретрансплантирано. Овој третман не се покажал како многу практичен (пациентката е подложена на два оперативни зафати) и не довел до широка клиничка примена. Со оваа метода се настојува да се подобри интрацелуларната комуникација помеѓу ооцитите и гранулоза клетките. Оваа хипотеза тврди дека на овој начин во третираното ткиво ин витро се прекинува Хипо (Hippo) сигналот и стимулирање АКТ pathway, кој ги промовира опстанокот и растот на клетката како одговор на екстрацелуларните сигнали. Со оваа метода се настојува да се подобри интрацелуларната комуникација помеѓу ооцитите и гранулоза клетките. Клучни протеини што се вклучени во овој процес се фосфатидилинозитол

Резултати од ин витро оплодување кај пациентки со намалени оваријални резерви по интраоваријална апликација на аутологна плазма збогатена со тромбоцити, активирана со калциум глуконат: плазма збогатена со тромбоцити перспективна терапија во иднина

3-киназа и Акт (протеин киназа Б). На овој начин се регрутираат герминативните клетки во аутологниот оваријален трансплантат на менопаузален оваријален кортекс што, од друга страна, води до реставрирање и подобрување на оваријалната функција (84).

2. ЦЕЛИ И ПРЕДМЕТ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Предмет на ова истражување е утврдување на соодветен метод и третман на пациентките со намалени оваријални резерви, со кој би се зголемиле стапката на клиничка бременост и стапката на живороденост како најважни одлучувачки параметри што го дефинираат успехот од ин витро фертилизација.

Почетните истражувања водат кон следење на биомаркерите за процена на оваријалните резерви. Преку нив во оваа докторска дисертација се прави обид да се стави акцент на позитивниот ефект од употребата на автологна плазма збогатена со тромбоцити (PRP), како нов потенцијален третман за лекување на оваријален инфертилитет. Со оваа студија сакаме да потврдиме дека третманот со автологна плазма збогатена со тромбоцити може да доведе до оваријална регенерација и реактивација на фоликулогенезата, со што доведува до продолжување на репродуктивниот потенцијал на жената. Тоа води кон зголемување на стапката на клиничка бременост и стапката на живородени деца кај пациентките со намалени оваријални резерви.

Во контекст на оваа евалуација се следени следните параметри:

Примарни мерења (временски период на следење од 12 месеци по направена оваријална рејувенација):

- ✓ *ИВФ-параметри со кои се следи контролирана оваријална стимулација*: денови на индукција, број на потрошени ампули, број на фоликули, број на пунктирани фоликули, број на зрели јајце-клетки, квалитет на ооцити, максимална концентрација на естрадиол на денот на hCG администрација, како и дебелината на ендометриум на денот на ембриотрансфер.
- ✓ *ИВФ-параметри со кои се дефинира успехот од ин витро фертилизација*: фертилизациона стапка, имплантациона стапка, стапка на клиничка бременост, стапка на живородени деца.

Секундарни мерења (временски период на следење од 1 до 3 месеци по направена оваријална рејувенација):

- ✓ промени на нивото на фоликул-стимулирачки хормон (FSH);
- ✓ серолошки промени на нивото на антимицеров хормон (AMH);

Со важност од 8.5.2018 година

- ✓ серолошки промени на нивото на естрадиол;
- ✓ промени на вкупниот број на антралните фоликули (AFC) .

2.1. Цел

До денес не постои ефикасен третман кој ќе доведе до редуцирање на фоликуларната атрезија и ќе доведе до продолжување на фертилниот потенцијал кај оваа група пациентки.

Замрзнувањето на јајце-клетки е прв чекор во превенција кај рано детектирани пациентки со намалени оваријални резерви. Како последна опција во тешки случаи се нуди донација на јајце-клетки или евентуално посвојување.

Нашата цел со оваа студија е со употребата на автологна плазма збогатена со тромбоцити да се потврди нејзиниот позитивен ефект врз обновувањето на оваријалната функција со истовремено реактивирање на фоликулогенезата. На тој начин би се зголемил квантитативниот и квалитативниот број на ооцити добиени во тек на ИВФ-постапката. Целта е зголемување на стапката на клиничка бременост и стапката на живородени деца кај пациентките со намалени оваријални резерви.

2.2 Работна хипотеза

Преку оваа студија треба да се евалуира позитивниот терапевтски потенцијал од третманот со PRP врз основа на медицина базирана на докази.

На овој начин може да се осигури правилна селекција на пациентки и да се направат потребните истражувачки чекори за да се обезбеди адекватен бенефит од употребата на PRP како третман за лекување на оваријален инфертилитет кај одредена популација.

По верификацијата на нашите прелиминарни резултати, перспективно, оваа метода може да има и одредена терапевтска и клиничка вредност. Се смета дека резултатите од оваа докторска дисертација ќе дадат научен придонес во областа на репродуктивната медицина.

3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

3.1 Дизајн на студијата

Примероците се земаат само од пациентки кои, по детално објаснување на постапката, целта и нивните права, своерачно ќе потпишат писмена согласност за интервенција. Покрај тоа, информациите од пациентките се обработуваат конфидентно и согласно одредбите од Законот за заштита на лични податоци. Дозволата за добивање и користење материјали и податоци од пациентите во студијата е одобрена од страна на етичка комисија при ПЗУ Ремедика, Скопје.

Селекцијата на пациенти е направена според однапред утврдени критериуми. Само клинички и лабораториски податоците од пациентите кои се релевантни за студијата се искористени за статистичка анализа. Во предложената клиничка студија со проспективен пристап се направи клиничко следење на 30 пациенти кај кои е направена оваријална рејувенација преку трансвагинална интраоваријална апликација на автологна плазма збогатена со тромбоцити.

Контролната група е составена од 30 пациенти со слични карактеристики во однос на возраст, индекс на телесна маса (BMI), од англ. *body mass index*, должина на траење на инфертилитет и кај кои не е направена процедура на оваријална рејувенација, а кои се класифицирани во група на PORs. Тие се подложени на постапка за ИВФ во истиот временски период. Целта е да се одреди севкупната ефикасност од оваријалното подмладување на јајчниците како одделна постапка од стандардните етаблирани постапки на ИВФ-протоколи за индуцирање на PORs пациентки на нашиот оддел.

По рејувенацијата кај испитуваната група е направена ин витро фертилизација во период од 1 до 3 месеци. Промените во оваријалната функција се следени преку оваријалните маркери, со одредување на нивото на FSH, LH, естрадиол и вкупниот број на антрални фоликули од двата овариуми детерминирани пред и по интраоваријална апликација на PRP.

Клиничките и лабораториски анализи се направени во Лабораторијата за асистирани репродукција и ин витро фертилизација при ПЗУ Ремедика во Скопје.

3.2 Критериуми за вклучување и исклучување во студијата

Инклузиони критериуми

- ✓ потпишана согласност за учество во студијата
- ✓ жени над 30 год. возраст
- ✓ присуство на најмалку еден овариум
- ✓ ИВФ како метода на забременување
- ✓ најмалку едно неуспешно ИВФ
- ✓ жени кои се со намалени оваријални резерви или низок АМН
- ✓ нивоата на FSH, LH, естрадиол, детерминирани пред PRP-третманот кои одговараат по дефиниција за PORs/

Ексклузиони критериуми

- имуноглобулинска дефициенција
- Тарнеров синдром или други генски фактори како причина за прематурна оваријална инсуфициенција
- повреди или операции на овариуми или карлично дно
- употреба на антикоагулантна терапија пред да се прави интервенција
- бременост
- ментални нарушувања
- активни супстанции наркотици или алкохол
- карцином од гинеколошка или негинеколошка природа
- хронична пелвична болка
- инфертилитет кој временски трае повеќе од 10 години
- пациентки над 42 год. возраст
- пациентки со мешана патологија (ендометриоза, миоми, полипи, идиопатски стерилитет, ПЦОС или конгенитални аномалии на матката)
- пациентки кај кои се направени големи хируршки операции, користење на антикоагулантна терапија или психотропни средства, акутни инфективни состојби, хемоглобин помал од 11g/L или помал број на тромбоцити од $150 \times 10^3/\mu\text{L}$
- сите парови кај кои дополнително е утврден машки фактор како една од причините за неплодност се исклучени од студијата.

Анализата на семениот материјал се изведува според протоколот на Светска здравствена организација ажуриран во 2010 година (16), а земени се предвид само парови каде што е утврдена

нормозооспермија кај партнерот, т.е. број на сперматозоиди $>20 \times 10^6/\text{ml}$; подвижност $> 50\%$ и нормални морфолошки форми, според критериумите на Kruger, $>8\%$.

3.3 Метода - трансвагинална интраоваријална интракортикална апликација на автологна плазма збогатена со тромбоцити

Трансвагинална интраоваријална апликација на автологна плазма збогатена со тромбоцити (оваријална рејувенација) е направена кај жени со или без менструација во кој било период од менструалниот циклус. Оваријалната рејувенација е постапка во два чекора. PRP се спрема со RegenACR-C кит. Истиот е FDA одобрен сет. Најпрво се зема 10 ml периферна крв во специјални епрувети со цел да се направи центрифугирање и сепарирање на белите крвни клетки и тромбоцити. Епруветите се ставаат во апарат за центрифугирање, а брзината на вртежи во минута се поставуваат според инструкцииите на производителот. Параметрите на центрифугата се подесуваат според следните вредност: времетраење од 5 минути и центрифугална сила 1500g. Целата постапка на обработка на крв се одвива на одделот за ИВФ. Автологна, тромбоцитно збогатена плазма со протеински фактори на раст се активира со калциум глуконат и во временски период од 2 минути се аплицира во јајниците. Се аплицира трансвагинално под ултразвучно контрола.

Интервенцијата се изведува при краткотрајна интравенска анестезија, а во просек не е подолга од 15 мин. Пред интервенција пациентката е гладна и жедна во последните 6 часа, што е класична процедура за подготовка на пациентка за ИВФ-постапка. Потоа пациентката останува во болница не подолго од 1 час пред да биде испуштена во присуство на член на фамилија или пријател. Ризици од интервенција се постоперативна болка, температура или внатрешно крвавење, кои во многу ретки случаи бараат и хоспитализација.

3.4 Протокол на работа

3.4.1 Подготовка на автологна плазма збогатена со тромбоцити

Според класификацијата предложена од Ehrenfest, дефинирани се 4 различни типа PRP, во зависност од содржината на клетките и присуството на фибрин. Во однос на класификацијата на PRP, во оваа студија се користи комерцијален кит на PRP со ниска концентрација на

тромбоцити (2,5x3 пати), Regen PRP, (Regen PRP, (Regen Laboratory, Mont-sur-Lausanne, Switzerland) (17). Процесот е спроведен под строги асептични услови, како и оптимални регулативи за температурата, т.е. 21-24°C. PRP е подготвена според упатствата на производителот. Како активатор се користи калциум глуконат. По активирањето, во период помал од 2 мин., 3-5 ml од PRP се инјектираат во секој јајчник под трансвагинално ултразвучна контрола. Интервенцијата се прави под краткотрајна интравенска анестезија со пропофол, по протокол поставен од нашиот оддел за ИВФ. Целата интервенција трае од 15 до 20 минути. Ние користиме игли за аспирација со еден лумен од 30 cm, 7G aspiration needles (COOK / Australia).

3.4.2 Подготовка на пациентки за постапка на ин витро фертилизација

Пациентките се евалуирани по однапред одреден протокол за работа. Тој вклучува: преовулаторен ултразвучен преглед, анализа на хормонален статус 3. ден од менструален циклус, ПАП и микробиолошки брисеви, крвна група, крвна слика и инфективни маркери (Hbs Ag, anti HCV, anti HIV).

Во постапката на индукција на овулација е користен протокол со антагонисти.

Стимулацијата на јајниците е извршена според препораките на Американското здружение за репродуктивна медицина (86). Користен е mild protocol или лесна, блага контролирана стимулација на јајниците кај сите пациентки. Во протоколот се користени 100 mg/ден кломифен цитрат, почнувајќи од 2 до 6 ден од менструалниот циклус, додавајќи мала доза на гонадотропин (50 до 150 IU/d) и антагонист (цетротиде 0,25) кога големината на фоликулот е со дијаметар ≥ 14 mm.

Хуман хорионски гонадотропин (hCG, 5 000 IU) за активирање на созревање на ооцитата е ординиран кога нивото на E2 е ≥ 200 pg/ml по фоликул, односно големина на фоликул ≥ 16 mm во дијаметар. Следењето на пациентките е мониторирано на фоликулометриска листа по однапред утврден протокол кој вклучува: ултразвучна фоликулометрија, внесување на вредностите на хормони, квантитативно и квалитативно мерење на ендометриум, се запишува бројот на ординирани ампули и денот на ординирање на hCG.

Ултразвучна фоликулометрија е направена во амбуланта за УЗ дијагностика со користење ултразвучен апарат Toshiba Aplio MX и вагинална сонда од 6 MHz. Прегледите се правени по спонтано празнење на мочниот меур, во легната положба со лесно свиткани колена. Фоликулите се мерат од внатрешната страна на фоликулот, а за вредност се зема средната аритметичка вредност од двата пречника на фоликулот

Со важност од 8.5.2018 година

(дијаметар 1, најголем пречник и дијаметар 2 кој е нормален на него) изразена во милиметри. По добивање на лонгитудинален пресек на утерус ќе се мери и дебелината на ендометриум на местото каде што ендометриумот е најдебел. Се мери како максимална оддалеченост помеѓу рефлектирачкиот меѓупростор на ендометриум – миометрална јункција, со пласирање на калиперите од површината на базален ендометриум низ ендометријален кавум до другата базална површина на ендометриум внимателно да не се вклучат хипоехогени зони на миометриум во ова мерење.

Бидејќи не е регистрирана значајна разлика во дебелината на ендометриумот на денот на hCG и денот на ембриотрансфер, во клиничката практика дебелината на ендометриум измерена на денот на апликација на hCG се зема за последна измерена вредност.

Третманот е адаптиран во согласност со возраста на пациентот, бројот и големината на фоликулите и нивото на E2.

3.4.3 Интрацитоплазматично внесување на сперматозоид – ICSI (ang. Intracytoplasmic sperm injection) и евалуација на бластомери

По 34-36 часа од апликација на hCG кај пациентката се прави трансвагинална пункција на фоликули и аспирација на ооцити. Колектирање на јајце-клетките трансвагинално е со користење трансвагинална сонда од 6 MHz со ултразвучен водич, со користење ултразвучен апарат Toshiba Aplio MX. Аспирацијата на фоликуларната течност се изведува со едноканална игла со дијаметар и должина 17 G/30 sm (K-OSN-1730-B-60, COOK Australia). ICSI е користена како метода за оплодување кај сите пациентки вклучени во студијата.

Кај сите пациентки оплодувањето на јајце-клетка е направено со интраплазматично внесување на сперматозоидот –ICSI. По 18 часа од оплодувањето се направи првата контрола за проверка на фертилизацијата со појава на пронуклеуси во внатрешноста на цитоплазмата. За евалуација на ембрионалниот развој се користи системот на бодирање на Хардарон и неговите колеги. На третиот ден од развојот, ембрионите треба да имаат по 8 клетки или да започнува стадиум на компакција. Во нашата студија ембриотрансферот е правен третиот, т.е. петтиот ден од денот на трансвагиналната пункција и во зависност од квалитетот на ембрионот враќани се максимум до 2 ембриони.

3.4.4 Ембриотрансфер

За ембриотрансфер пациентката се поставува на гинеколошки стол

во литотомна положба, по што се аплицира спекулум во вагина, со што се визуализира грлото на матката, а потоа следува промивка со физиолошки раствор и flash медиум подготвен од страна на нашата лабораторија (Earle's balanced salt solution, Sigma-Aldrich). Трансферот се изведува со меки, специјално дизајнирани ехосонични катетри (K-soft -5000, COOK Ob/Gyn, USA). Ембрионите претходно се ставаат во соодветен медиум за раст и одржување на бластоцисти (Quinn's advantage protein plus, blastocyst medium, SAGE, USA). Тие се аспирираат во катетер со 30 μ l медиум. Во катетерот се аспирирани селектираните ембриони со шприц (Injekt-F Tuberkulin Braun, Germany). Ембриологот го предава катетерот на лекарот по потврда на идентитетот на пациентот.

Трансферот се изведува со враќање на ембрионите под трансвезикална ехосонографска контрола користејќи абдоминална сонда 3 MHz (Toshiba Aplio mx). Катетерот се внесува во цервикален канал без претходна дилатација. Постојат доследни докази во корист на абдоминалниот ултразвук кој може да обезбеди правилна точност и прецизност во поставувањето на ембрионите во матката. Анестезија не е потребна. По повлекувањето, катетерот му се предава на ембриологот, кој прави контрола на катетерот за да се провери евентуално задржување на некој од ембрионите во него.

3.4.5 Потврда на бременост

Тестот за бременост се прави по 14 дена од направениот ембриотрансфер. Тестот се прави серолошки, со одредување на нивото на b-hCG. Human Chorionic Gonadotropin Hormone (hCG) е двоверижен гликопротеин кој го лачи трофобластот. Вредностите поголеми од >30mIU/ml се сметаат за позитивни и индицираат бременост.

УЗ-прегледи се направени во амбуланта за гинеколошки УЗ со користење ултразвучен апарат Toshiba Aplio MX и вагинална сонда од 6 MHz. Клиничка бременост се дефинира со УЗ-потврда на гестациски сакус со ембрионално ехо и позитивна срцева акција. Главен и одлучувачки параметар по УЗ-потврда на бременост за одредување на успехот од ин витро фертилизација е стапката на живороденост, од англ. live birth rate, па затоа во оваа перспективна студија е проследен исходот на сите клинички потврдени бремености.

4. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА НА ПОДАТОЦИ

Анализата на податоците е изведена во статистичката програма Statistica 7.1 for Windows и SPSS Statistics 23.0

Применети се следните методи:

1. Во анализата на сериите со атрибутивни белези (претходни ИВФ-обиди, претходни бремености, претходни абортуси, претходни операции, начин на стимулација, ембриотрансфер (ден), ВНСГ (наод, исход) одредувани се проценти на структура (%);

1.1 Разликите/кростабулација кај сериите со атрибутивни белези се тестирани со примена на Fisher's Exact Test / Monte Carlo Sig. (2-sided)(p);

2. Кај сериите со нумерички белези (возраст, FSH (пред & по PRP), АМН (пред & по PRP), естрадиол (пред & по PRP), антрални фоликули (пред & по PRP), број на тромбоцити (PRP), добиени јајце-клетки, оплодени јајце-клетки, трансферирани ембриони, естрадиол (стимулација), број на ампули, изработена е Descriptive Statistics (Mean; Std.Deviation;±95,00%CI; Median, Minimum, Maximum);

2.1 Дистрибуцијата на податоците е тестирана со: Kolmogorov-Smirnov test; Lilliefors test; Shapiro-Wilks test (p);

2.2 Разликата во вредноста на анализираните параметри (пред & по PRP) во испитуваната група (PRP) е тестирана со T-test for Dependent Samples (t / p) и Wilcoxon Matched Pairs Test (Z / p);

2.3 Разликата во анализираните параметри помеѓу трите групи пациентки (испитувана група, контролна група (без стимулација), контролна група (со стимулација), тестирана е со Analysis of Variance (F;p)/LSD Test (p); Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks (H;p)/Multiple Comparisons p values (2-tailed) (p);

2.3.1 Разликата во анализираните параметри помеѓу две групи пациентки е тестирана со Mann-Whitney U Test (Z, p);

2.4 Корелацијата помеѓу BMI & FSH по PRP, BMI & естрадиол по PRP е анализирана со Pearson коефициент на корелација (r/p);

2.5 Односот помеѓу FSH (по PRP)/Години (Жени) & BMI; AMH (по PRP)/Години (Жени) & BMI; Број на антрални фоликули (по PRP)/Години (Жени) & BMI, е испитуван со Multiple Regression (R, p);

3. Изработени се фертилизациона стапка, имплантациона стапка, стапка на бременост, стапка на породени во трите групи пациентки (%);

3.1 Разликата во вредноста на стапките помеѓу трите групи пациентки е тестирана со Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks (H;p).

4. Во анализата на корелацијата помеѓу бројот на тромбоцити (PRP) & FSH (по PRP), бројот на тромбоцити (PRP) & естрадиол (по PRP) е применет Pearson коефициент на корелација (r/p);

5. Во анализата на корелацијата помеѓу бројот на тромбоцити (PRP) & AMH (по PRP), бројот на тромбоцити (PRP) & број на антрални фоликули (по PRP) е применет Sperman Rank Order R (R/p).

Сигнификантноста е одредувана за $p < 0,05$.

Податоците се табеларно и графички прикажани.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Базичните карактеристики на група А

5.1.1 Возраст на пациентките на испитувана група А

На табела 1 и графикон 1, прикажаните резултати се однесуваат на возраста кај жените и мажите вклучени во испитувањето.

Возраста на жените варира во интервалот $37,47 \pm 38,7$ години, $\pm 95,00\% \text{CI}: 35,32-39,61$ години, минималната возраст изнесува 31 година, а максималната возраст изнесува 42 години.

Табела 1. Возраст на жените и мажите во група А

Возраст	N	Mean	Confidence - 95,00%	Confidence + 95,00%	Minimum	Maximum	Std.Dev.
Жени	30	37,47	35,32	39,61	31	42	3,87

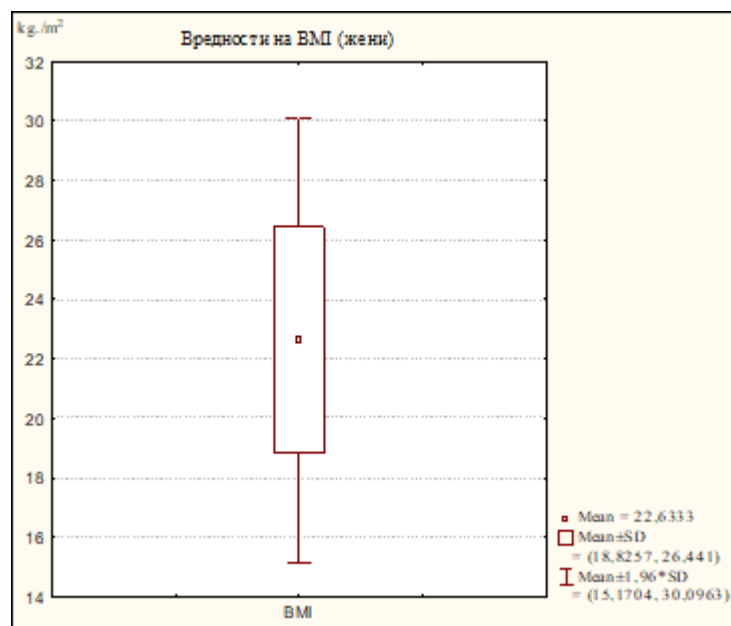
5.1.2 BMI (body mass index) на испитувана група А

Вредностите на BMI се прикажани на табела 2 и графикон 2.

Вредностите на BMI кај пациентките варираат во интервалот $22,63 \pm 3,81$ kg/m^2 , $\pm 95,00\% \text{CI}: 20,52-24,74$ kg/m^2 , минималната вредност изнесува $18,30$ kg/m^2 , а максималната вредност изнесува $32,30$ kg/m^2 .

Табела 2. Вредности на BMI во група А

Variable	N	Mean	Confidence - 95,00%	Confidence + 95,00%	Minimum	Maximum	Std.Dev.
BMI	30	22,63	20,52	24,74	18,30	32,30	3,81



Графикон 1

5.1.3 Претходни ин витро обиди (ИВФ) во групата А

Од вкупно 30 пациентки, 4 (13,3%) пациентки имале по еден ИВФ-обид, 10 (33,3%) пациентки имале по два ИВФ-обиди, 6 (20,0%) пациентки имале по три ИВФ-обиди, 4 (13,3%) пациентки имале по четири ИВФ-обиди, а 6 (20,0%) пациентки имале по пет ИВФ-обиди (табела 3).

Табела 3. Број на претходни ИВФ-обиди

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 1	4	13,3	13,3	13,3
2	10	33,3	33,3	46,7
3	6	20,0	20,0	66,7
4	4	13,3	13,3	80,0
5	6	20,0	20,0	100,0
Total	30	100,0	100,0	

5.1.4 Хормонални и функционални оваријални маркери кај пациентки од група А

Прикажаните резултати на табела 4. се однесуваат на FSH и AMH пред апликација на автологна плазма збогатена со тромбоцити (PRP).

Вредноста на FSH пред интраоваријална апликација на PRP варира во интервалот $19,27 \pm 5,29$ IU/L, $\pm 95,00\%CI: 14,35-20,20$ IU/L, минималната вредност изнесува 13,00 IU/L, а максималната вредност изнесува 26,10 IU/L.

Вредноста на AMH пред PRP варира во интервалот $0,35 \pm 0,19$ ng/ml, $\pm 95,00\%CI: 0,24-0,46$ ng/ml, минималната вредност изнесува 0,05 ng/ml, а максималната вредност изнесува 0,69 ng/ml.

Вредноста на естрадиол пред PRP варира во интервалот $71,06 \pm 31,60$ pmol/L, $\pm 95,00\%CI: 53,56-88,56$ pmol/L, минималната вредност изнесува 30,00 pmol/L, а максималната вредност изнесува 155,00 pmol/L.

Табела 4. Вредности на FSH, AMH, естрадиол /пред апликација на плазма (PRP)

Variable пред PRP	N	Mean	Confidence - 95,00%	Confidence + 95,00%	Minimum	Maximum	Std.Dev.
FSH	30	19,27	14,35	20,20	13,00	26,10	5,29
AMH	30	0,35	0,24	0,46	0,05	0,69	0,19
Естрадиол	30	71,06	53,56	88,56	30,00	155,00	31,60

5.1.5 Антрални фоликули пред апликација на плазма

Бројот на антрални фоликули кај пациентките пред апликација на плазма (PRP) варира во интервалот $4,53 \pm 0,99$ фоликули, средниот број на антрални фоликули изнесува 4; минималниот број изнесува 3 фоликули, а максималниот број изнесува 6 фоликули (табела 5).

Табела 5. Антрални фоликули пред апликација на плазма (PRP)

N	Valid	30
	Missing	0
Mean		4,53
Median		4
Std. Deviation		,99
Range		3
Minimum		3
Maximum		6

Од вкупно 30 пациентки, пред PRP 4 (13,3%) пациентки имале по 3 антрални фоликули, 12 (40,0%) пациентки имале по 4 антрални фоликули, 8 (26,7%) пациентки имале по 5 антрални фоликули, а 6 (20,0%) пациентки имале по 6 антрални фоликули (табела 5.1).

Табела 5.1 Вкупен број на антрални фоликули пред PRP

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 3	4	13,3	13,3	13,3
4	12	40,0	40,0	53,3
5	8	26,7	26,7	80,0
6	6	20,0	20,0	100,0
Total	30	100,0	100,0	

5.2. Разлики во базичните карактеристики помеѓу групите А и В

5.2.1 Возраст

За $F = 0,01$ и $p > 0,05$ ($p = 0,99$) нема значајна разлика во возраста помеѓу пациентките третирани со плазма збогатена со тромбоцити (PRP) ($37,47 \pm 3,87$ години) и контролната група на пациентки ($37,64 \pm 3,20$ години) (табела 6.).

Табела 6. Разлика помеѓу групи/возраст

	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	Df Error	MS Error	F	p
Age (f)	0,30	2	0,15	418,68	41	10,21	0,01	0,99

5.2.2 BMI

За $N = 1,71$ и $p > 0,05$ ($p = 0,42$) нема значајна разлика во вредностите на BMI помеѓу пациентките третирани со плазма збогатена со тромбоцити (PRP) ($22,63 \pm 3,81$ кг./м²) и контролната група на пациентки ($24,07 \pm 5,01$ кг./м²) (табела 7).

Табела 7. Разлика помеѓу групи/BMI

Depend: BMI	Code	Valid N	Sum of Ranks
Group A (PRP)	1	30	290,50
Group B	2	30	317,00

5.2.3 Број на претходни ИВФ-обиди

За $N = 1,99$ и $p > 0,05$ ($p = 0,37$) нема значајна разлика во бројот на претходни ИВФ-обиди помеѓу пациентките третирани со плазма збогатена со тромбоцити (PRP) и контролната група на пациентки (табела 8).

Табела 8. Разлика помеѓу групи/број на претходни ИВФ-обиди

Depend: Број на претходни ИВФ-обиди	Code	Valid N	Sum of Ranks
Group A (PRP)	1	30	391,50
Group B	2	30	279,00

5.2.4 Разлики во вредностите на FSH (пред интраоваријална апликација на PRP)

За $N = 3,83$ и $p > 0,05$ ($p = 0,15$) нема значајна разлика во вредноста на FSH (пред PRP) помеѓу пациентките третирани со плазма збогатена со тромбоцити (PRP) ($19,27 \pm 5,29$ IU/L) и контролната група на пациентки ($16,22 \pm 7,05$ IU/L) (табела 9).

Табела 9. Разлика помеѓу групи/FSH

Depend: FSH (пред PRP)	Code	Valid N	Sum of Ranks
Group A (PRP)	1	30	391,50
Group B	2	30	279,00

5.2.5 Разлика во вредностите на AMH (пред интраоваријална апликација на PRP)

За $N = 7,07$ и $p < 0,05$ ($p = 0,03$) постои значајна разлика во вредноста на AMH (пред PRP) помеѓу пациентките од испитуваната група (PRP), групата на пациентки без стимулација и групата на пациентки со стимулација (табела 10).

Табела 10. Разлика помеѓу групи/AMH

Depend: AMH (пред PRP)	Code	Valid N	Sum of Ranks
Group A (PRP)	1	30	234,50
Group B	2	30	365,00

Вредноста на AMH кај пациентките од контролната група ($0,56 \pm 0,31$ ng/ml) за $p > 0,05$ ($p = 0,19$) незначајно е поголема во однос на вредноста на AMH (пред PRP) кај пациентките од испитуваната група A (PRP) ($0,35 \pm 0,19$ ng/ml).

5.2.6 Разлика во бројот на антрални фоликули помеѓу групите (пред интраоваријална апликација на PRP)

За $N = 0,96$ и $p > 0,05$ ($p = 0,62$) нема значајна разлика во бројот на антрални фоликули (пред PRP) помеѓу групите, група А (PRP) ($4,53 \pm 0,99$) и група В ($4,21 \pm 1,19$) (табела 11). Целокупните резултати се сумирани во табела 12.

Табела 11. Разлика помеѓу групи/антрални фоликули (пред PRP)

Depend: Антрални фоликули (пред)	Code	Valid N	Sum of Ranks
Group A (PRP)	1	30	356,00
Group B	2	30	277,50

Табела 12. Разлики во демографските карактеристики и оваријалните маркери меѓу двете групи

Characteristics	Group A	group B	p
Age(years)	$38,47 \pm 2,97$	$38,64 \pm 3,20$	$p = 0,99$
Body mass index kg/m^2	$23,93 \pm 2,91$	$25,07 \pm 4,89$	$p = 0,42$
Infertility duration	$4,0 \pm 2,1$	$4,5 \pm 1,2$	$p = 0,37$
Antral follicle count	$4,53 \pm 0,99$	$4,21 \pm 1,19$	$p = 0,62$
FSH on day 3	$19,27 \pm 2,29$	$16,22 \pm 4,05$	$p = 0,15$
Estradiol on day 3	$71,06 \pm 31,30$	$72,54 \pm 28,64$	$p = 0,85$
AMH	$0,35 \pm 0,19$	$0,56 \pm 0,31$	$p = 0,19$

E₂, estradiol; FSH, follicle-stimulating hormone; AMH, anti-Müllerian hormone; antral follicle count; p Values pre- vs. post-ПРП calculated by Students t-test.

5.3. Обработка на плазма

На табела 13 се прикажани резултати кои се однесуваат на бројот на тромбоцити.

Бројот на тромбоцити варира во интервалот $226,27 \pm 82,80/10^9L$, $\pm 95,00\%CI: 180,42-272,12/10^9L$, минималната вредност изнесува $106,00/10^9L$, а максималната вредност изнесува $351,00/10^9L$.

Табела 13. Број на тромбоцити (PRP)

	N	Mean	Confidence - 95,00%	Confidence + 95,00%	Minimum	Maximum	Std.Dev.
PRP	30	226,27	180,42	272,12	106,00	351,00	82,80

5.4. Дескриптивна статистика на параметри за оваријална стимулација/ разлика помеѓу групите А и В

5.4.1 Ниво на естрадиол

Вредноста на естрадиол кај пациентките од контролната група ($528,14 \pm 315,99$ pmol/L.) за $Z = -0,57$ и $p > 0,05$ ($p = 0,57$) незначајно е поголема отколку кај пациентките од испитуваната група А (PRP) ($444,53 \pm 331,87$ pmol/L.) (табела 14).

Табела 14. Разлика помеѓу групи/естрадиол

Variable	Rank Sum Group A	Rank Sum Group B	U	Z	p- level	Valid N Group PRP	A	Valid N Group B
Естрадиол	212,00	223,00	92,00	-0,57	0,57	30		30

5.4.2 Број на ординирани ампули (75 IE)

Бројот на ординирани ампули кај пациентките од контролната група ($84,00 \pm 12,91$) за $Z = -4,18$ и $p < 0,001$ ($p = 0,00$) значајно е поголем отколку кај пациентките од испитуваната група (PRP) ($28,07 \pm 12,20$) (табела 15).

Табела 15. Разлика помеѓу групи/број на ординирани ампули

Variable	Rank Sum Group A	Rank Sum Group B	U	Z	p-level	Valid N Group A	Valid N Group B
Бр. ампули	260,00	610,00	10,00	-4,18	0,000	30	30

5.4.3 Денови на стимулација

Бројот на денови на стимулација во групата А варира во интервал од $9,45 \pm 1,91$; $\pm 95,00\%$. Конфидекс интервал : 8,90-10,41, а во групата В варира во интервал од $9,41 \pm 1,35$; $\pm 95,00\%$. Конфидекс интервал : 9,08-10,17.

За $N=0,39$ и $p > 0,05$ ($p=0,82$) нема значајна разлика во бројот на деновите на стимулација помеѓу пациентките.

5.4.4 Дебелина на ендометриум

Дебелината на ендометриумот во групата А варира во интервал од $9,71 \pm 1,29$; $\pm 95,00\%$. Конфидекс интервал : 9,22-10,20, а во групата В варира во интервал од $9,59 \pm 1,61$; $\pm 95,00\%$. Конфидекс интервал : 8,98-10,20.

За $N=0,83$ и $p > 0,05$ ($p=0,66$) нема значајна разлика во дебелината на ендометриум помеѓу пациентките.

5.4.5 Вкупен број на јајце-клетки (ооцити, M2)

Бројот на добиени јајце-клетки кај пациентките во група А варира во интервалот $1,87 \pm 1,13$ јајце-клетки, средниот број на добиени јајце-клетки изнесува 2; минималниот број изнесува 1 јајце-клетка, а максималниот број изнесува 5 јајце-клетки (табела 16).

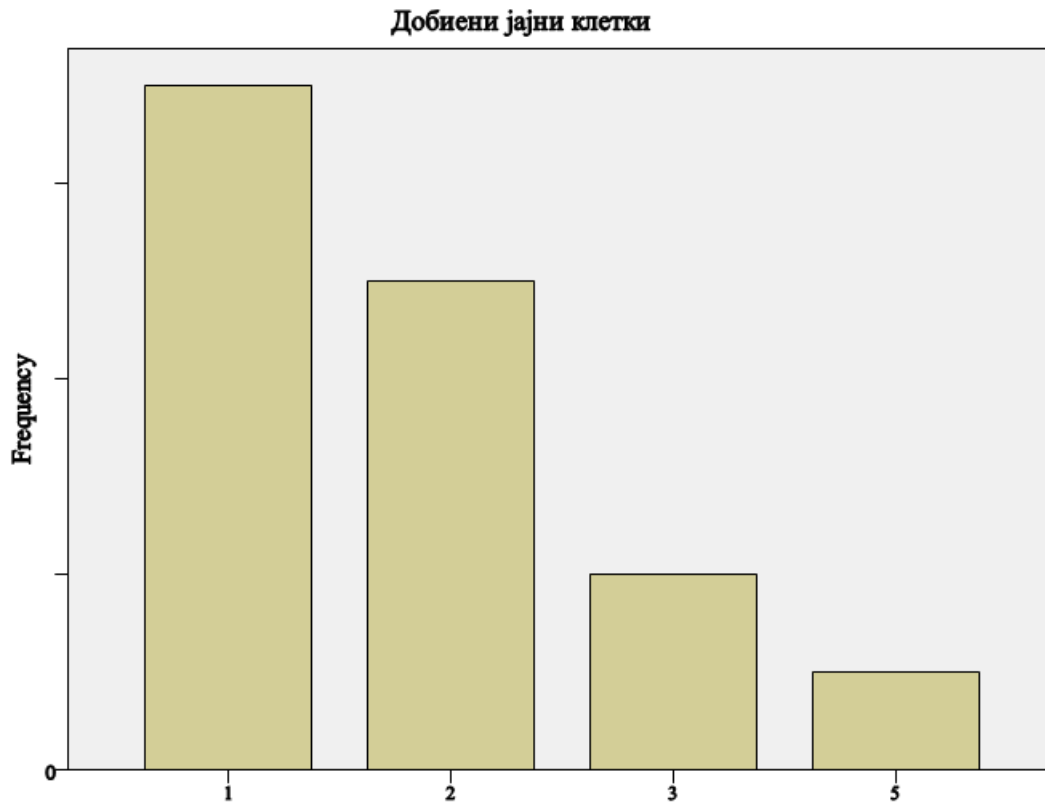
Табела 16. Добиени јајце-клетки

N	Valid	30
	Missing	0
Mean		1,87
Median		2
Std. Deviation		1,13
Range		4
Minimum		1
Maximum		5

Од вкупно 30 пациентки, кај 14 (46,7%) е добиена по една јајце-клетка, кај 10 (33,3%) пациентки добиени се по две јајце-клетки, кај 4 (13,3%) пациентки добиени се по три јајце-клетки, а кај 2 (6,7%) пациентки добиени се 5 јајце-клетки (табела 16.1 и графикон 2).

Табела 16.1 Добиени јајце-клетки

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 1	14	46,7	46,7	46,7
2	10	33,3	33,3	80,0
3	4	13,3	13,3	93,3
5	2	6,7	6,7	100,0
Total	30	100,0	100,0	



Графикон 2

Табела 17. Разлика помеѓу групите во бројот на M2 ооцити

Depend: Oocyte M2	Code	Valid N	Sum of Ranks
Group A (PRP)	1	30	348,00
Group B	2	30	447,00

Бројот на јајце-клетки кај пациентките од контролната група ($3,71 \pm 2,40$ ооцита) за $p > 0,05$ ($p = 0,20$) незначајно е поголем во однос на бројот на јајце-клетки кај пациентките од испитуваната група (PRP) ($1,87 \pm 1,13$ ооцита).

5.5 Дескриптивна статистика на параметри за следење на успехот од ин витро фертилизација/разлика помеѓу групите А и В

5.5.1. Вкупен број на оплодени јајце-клетки

Бројот на оплодени јајце-клетки во групата А варира во интервалот $1,33 \pm 0,62$ оплодени јајце-клетки, средниот број на оплодени јајце-клетки изнесува 1; минималниот број на оплодени јајце-клетки изнесува 1, а максималниот број оплодени јајце-клетки изнесува 3 (табела 18.).

Табела 18. Број на оплодени јајце-клетки

N	Valid	30
	Missing	0
Mean		1,33
Median		1
Std. Deviation		,62
Range		2
Minimum		1
Maximum		3

Од вкупно 30 пациентки, кај 22 (73,3%) е пациентки добиена по 1 оплодена јајце-клетка, кај 6 (20,0%) пациентки се добиени по 2 оплодени јајце-клетки, а кај 2 (6,7%) пациентки се добиени 3 оплодени јајце-клетки (табела 18.1).

Табела 18.1 Број на оплодени јајце-клетки во група А

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 1	22	73,3	73,3	73,3
2	6	20,0	20,0	93,3
3	2	6,7	6,7	100,0
Total	30	100,0	100,0	

Табела 19. Разлика помеѓу групи / оплодени јајце-клетки

Depend: Оплодени јајце-клетки	Code	Valid N	Sum of Ranks
Group A (PRP)	1	30	322,50
Group B	2	30	427,50

Бројот на оплодени јајце-клетки кај пациентките од контролната група ($2,00 \pm 0,88$) за $p > 0,05$ ($p = 0,18$) незначајно е поголем во однос на бројот на оплодени јајце-клетки кај пациентките од испитуваната група (PRP) ($1,33 \pm 0,62$).

5.5.2 Број на трансферирани ембриони

Бројот на трансферирани ембриони во групата А варира во интервалот $1,20 \pm 0,41$ трансферирани ембриони, средниот број на трансферирани ембриони изнесува 1; минималниот број на трансферирани ембриони изнесува 1, а максималниот број на трансферирани ембриони изнесува 2 (табела 20.).

Табела 20. Број на трансферирани ембриони

N	Valid	30
	Missing	0
Mean		1,20
Median		1
Std. Deviation		,41
Range		1
Minimum		1
Maximum		2

Од вкупно 30 пациентки, кај 24 (80,0%) пациентки е трансфериран по 1 ембрион, кај 6 (20,0%) пациентки се трансферирани по 2 ембриони (табела 20.1).

Табела 20.1 Број на трансферирани ембриони

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 1	24	80,0	80,0	80,0
2	6	20,0	20,0	100,0
Total	30	100,0	100,0	

Бројот на трансферирани ембриони кај пациентките од контролната група ($1,50 \pm 0,65$ т.е.) за $p > 0,05$ ($p = 0,07$) незначајно е поголем во однос на бројот на трансферирани ембриони кај пациентките од испитуваната група А ($1,20 \pm 0,41$ т.е.).

5.5.3 Тест за бременост

Прикажаните резултати на табела 21 се однесуваат на ВНСГ, квантитативен тест за бременост.

Од вкупно 30 пациентки во групата А, ВНСГ-тестот за бременост бил позитивен кај 12 (40,0%) пациентки, негативен тест на бременост имале 14 (46,7%) пациентки, а 4 (13,3%) пациентки имале биохемиска бременост (позитивен само во крв и завршува со менструално крвавење).

Табела 21. ВНСГ-тест за бременост

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid Позитивен	12	40,0	40,0	40,0
Негативен	14	46,7	46,7	86,7
БХ бременост	4	13,3	13,3	100,0
Total	30	100,0	100,0	

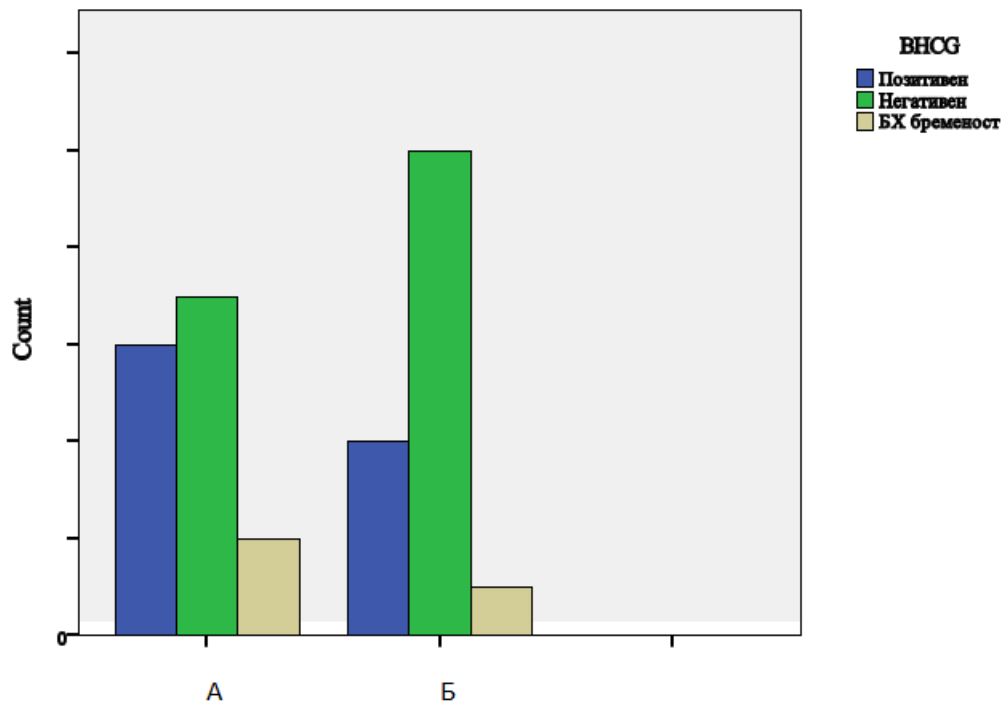
Прикажаните резултати на графикон 3 се однесуваат на разликите во наодите на ВНСГ-тест за бременост кај пациентките од двете групи.

Од вкупно 30 пациентки во испитуваната група (PRP), ВНСГ-тестот за бременост бил позитивен кај 12 (40,0%) пациентки, негативен тест на бременост имале 14 (46,7%) пациентки, а 4 (13,3%) пациентки имале биохемиска бременост (позитивен само во крв и завршува со менструално крвавење).

Од вкупно 30 пациентки во контролната група, ВНСГ-тестот за бременост бил позитивен кај 8 (26,7%) пациентки, негативен тест на бременост имале 20 (66,7%) пациентки, а 2 (6,7%) пациентки имале биохемиска бременост.

Во прикажаните резултати што се однесуваат на разликите во наодите на ВНСГ-тестот за бременост кај пациентките од двете групи, за Fisher's Exact Test = 3,50 и $p > 0,05$ ($p = 0,522$) / Monte Carlo Sig.(2-sided) / 0,509 – 0,535 / нема значајна разлика.

Bar Chart



Графикон 3

5.5.4 Стапки

5.5.4.1 Во групата на **пациентки третирани со плазма збогатена со тромбоцити (PRP)** се добиени следните стапки:

5.5.4.2 Фертилизациона стапка

Кај 30 пациентки третирани со PRP биле добиени 50 јајце-клетки. Од добиените јајце-клетки 40 биле оплодени. Фертилизационата стапка изнесува $80,67 \pm 25,42\%$.

5.5.4.3 Имплантациона стапка

Кај 30 пациентки се трансферирани 36 ембриони. Од 15 пациентки третирани со PRP 12 имале позитивен тест на бременост. Имплантационата стапка изнесува $33,33 \pm 44,99\%$.

5.5.4.4 Стапка на бременост

Од 30 пациентки третирани со PRP стапката на бременост изнесува $33,33 \pm 44,99\%$.

5.5.4.5 Испитувана група B

5.5.4.6 Фертилизациона стапка

Кај 30 пациентки со стимулација биле добиени 104 јајце-клетки. Од добиените јајце-клетки 56 биле оплодени. Фертилизационата стапка изнесува $65,60 \pm 25,35\%$.

5.5.4.7 Имплантациона стапка

Кај 30 пациентки се трансферирани 42 ембриони. Од 30 пациентки со стимулација 8 имале позитивен тест на бременост. Имплантационата стапка изнесува $19,04 \pm 28,95\%$.

5.5.4.8 Стапка на клиничка бременост

Од 30 пациентки 4 се породиле. Кај 30 пациентки се трансферирани 42 јајце-клетки. Стапката на бременост изнесува $10,71 \pm 28,95\%$.

5.5.4.9 Разлики во групите

На табела 22 се прикажани вредностите на фертилизациона стапка, имплантациона стапка, стапка на бременост, стапка на породени, во двете групи пациентки, како и разликите во вредноста на стапките помеѓу групите пациентки.

За $N=14,78$ и $p>0,051$ ($p=0,44$) не постои значајна разлика во вредноста на *фертилизационата стапка* помеѓу групите.

За $N=2,34$ и $p>0,05$ ($p=0,31$) нема значајна разлика во вредноста на *имплантационата стапка* помеѓу групите.

За $N=3,60$ и $p>0,05$ ($p=0,17$) нема значајна разлика во вредноста на стапката на бременост помеѓу групите.

За $N=3,78$ и $p>0,05$ ($p=0,15$) нема значајна разлика во вредноста на стапката на породени помеѓу групите.

Табела 22. Разлики помеѓу групи/стапки

Стапки	Група		p - вредност	
	Group A (PRP)	Group B	1 & 2	
Фертилизациона стапка	80,67±25,42	65,60±25,35	0,44	
Имплантациона стапка	33,33±44,99	19,04±28,95	0,70	
Стапка на клиничка бременост	33,33±44,99	10,71±28,95	0,69	
Стапка на породување	40,00±50,71	14,29±36,31	0,71	

p – вредност / PRP (1); group B (2);

Во прикажаните резултати што се однесуваат на разликите кај пациентките од двете групи, за Fisher's Exact Test = 3,43 и $p>0,05$ ($p=0,234$) / Monte Carlo Sig.(2-sided) / 0,223 – 0,245 / нема значајна разлика.

5.6 Промени на оваријалните хормонални и функционални маркери во групата А по интроваријална апликација на PRP

Прикажаните резултати на табела 23 и графикон 4 се однесуваат на FSH, AMH и естрадиол по интраоваријална апликација на автологна плазма (PRP).

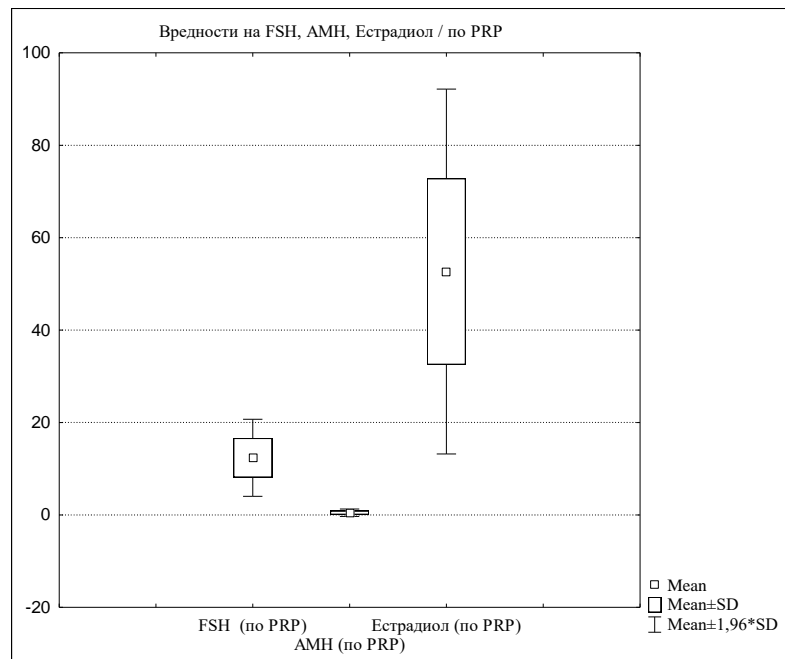
Вредноста на FSH по PRP варира во интервалот 12,38±4,26 IU/L, ±95,00%CI:10,03-14,74 IU/L, минималната вредност изнесува 7,60 IU/L, а максималната вредност изнесува 22,67 IU/L.

Вредноста на AMH по PRP варира во интервалот 0,49±0,41 ng/ml, ±95,00%CI:0,26-0,72 ng/ml, минималната вредност изнесува 0,03 ng/ml, а максималната вредност изнесува 1,70 ng/ml.

Вредноста на естрадиол по PRP варира во интервалот 52,69±20,15 pmol/L, ±95,00%CI:41,53-63,84 pmol/L, минималната вредност изнесува 15,24 pmol/L, а максималната вредност изнесува 80,00 pmol/L.

Табела 23. Вредности на FSH, AMH, естрадиол/по апликација на плазма (PRP)

Variable по PRP	N	Mean	Confidence - 95,00%	Confidence + 95,00%	Minimum	Maximum	Std.Dev.
FSH	30	14,38	10,03	14,74	9,6	22,67	4,26
AMH	30	0,49	0,26	0,72	0,03	1,70	0,41
Естрадиол	30	52,69	41,53	63,84	15,24	80,00	20,15



Графикон 4

Бројот на антрални фоликули кај пациентките по апликација на плазма (PRP) варира во интервалот $7,27 \pm 1,16$ фоликули, средниот број на антрални фоликули изнесува 7; минималниот број изнесува 6 фоликули, а максималниот број изнесува 9 фоликули (табела 24).

Табела 24. Антрални фоликули по апликација на плазма (PRP)

N	Valid	30
	Missing	0
Mean		7,27
Median		7
Std. Deviation		1,16
Range		3
Minimum		6
Maximum		9

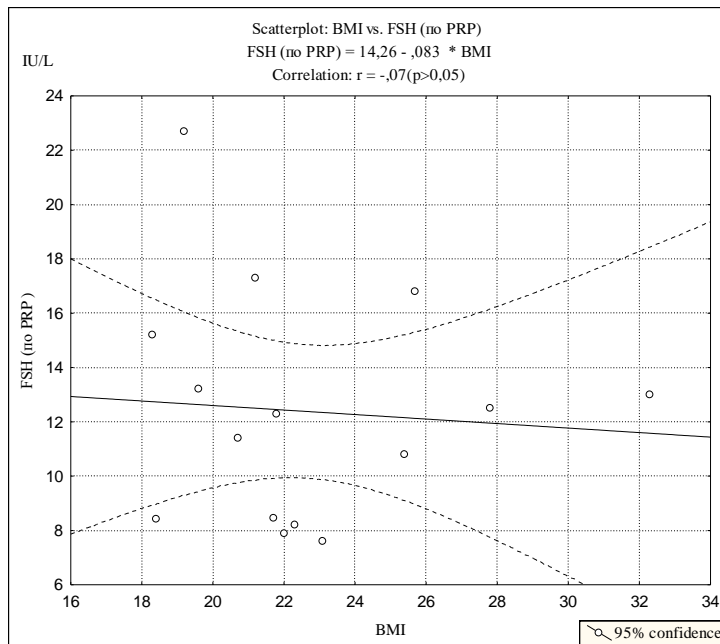
Од вкупно 30 пациентки, по интраоваријална апликација на PRP, 10 (33,3%) пациентки имале по 6 антрални фоликули, 8 (26,7%) пациентки имале по 7 антрални фоликули, 6 (20,0%) пациентки имале по 8 антрални фоликули, а 6 (20,0%) пациентки имале по 9 антрални фоликули.

5.7 Корелација

5.7.1 BMI & FSH по PRP

На графикон 5 е прикажана корелацијата помеѓу BMI на пациентките и FSH по PRP. За $r = -0,07$ ($p > 0,05$) утврдена е многу слаба негативна незначајна корелација. Имено, со покачување на BMI на пациентките за единечна вредност (1 kg/m^2) вредноста на FSH по PRP (просечно) незначајно се намалува за $0,08 \text{ IU/L}$.

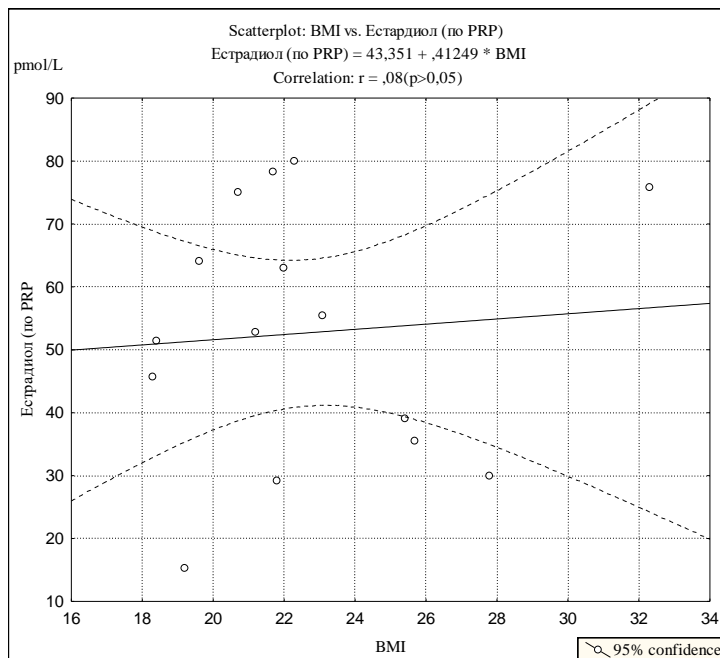
Резултати од ин витро оплодување кај пациентки со намалени оваријални резерви по интраоваријална апликација на аутологна плазма збогатена со тромбоцити, активирана со калциум глуконат: плазма збогатена со тромбоцити перспективна терапија во иднина



Графикон 5

5.7.2 BMI & естрадиол по PRP

На графикон 6 е прикажана корелацијата помеѓу BMI на пациентките и вредноста на естрадиол по PRP. За $r = 0,08$ ($p > 0,05$) утврдена е многу слаба позитивна незначајна корелација. Имено, со покачување на BMI на пациентките за единечна вредност (1 kg/m^2) вредноста естрадиол по PRP (просечно) незначајно се зголемува за $0,41 \text{ pmol/L}$.



Графикон 6

Со важност од 8.5.2018 година

5.8. Разлика на оваријалните маркери пред и по интраоваријална апликација на PRP

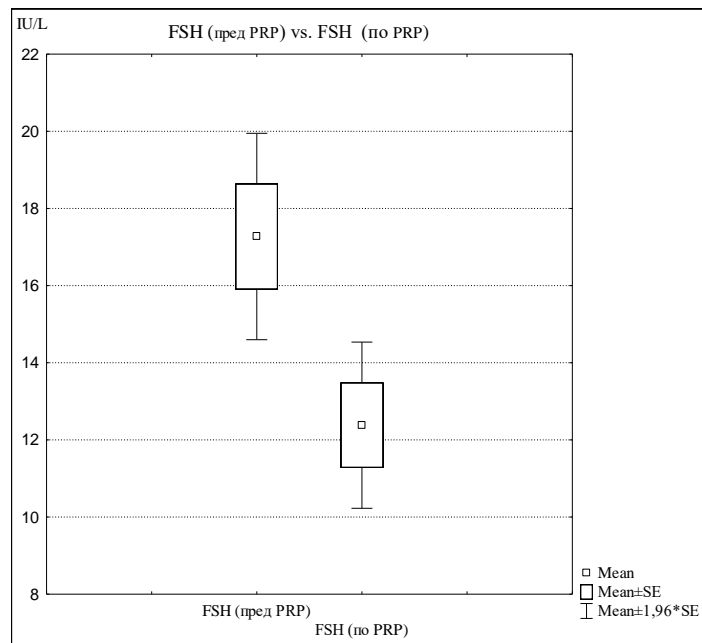
6.8.1 Разлика во вредности на FSH (пред & по давање PRP)

Разликата во вредности на FSH (пред & по давање PRP) е прикажана на табела 25 и графикон 7.

За $t=3,58$ и $p<0,01$ ($p=0,003$) вредноста на FSH по давањето PRP значајно е помала во однос на вредноста на FSH пред давањето PRP.

Табела 25. Разлика во вредности на FSH (пред & по давање PRP)

Variable	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv. Diff.	t	Df	p
FSH (пред PRP)	19,27	5,29						
FSH (по PRP)	14,38	4,26	15	4,89	5,29	3,58	14	0,003



Графикон 7

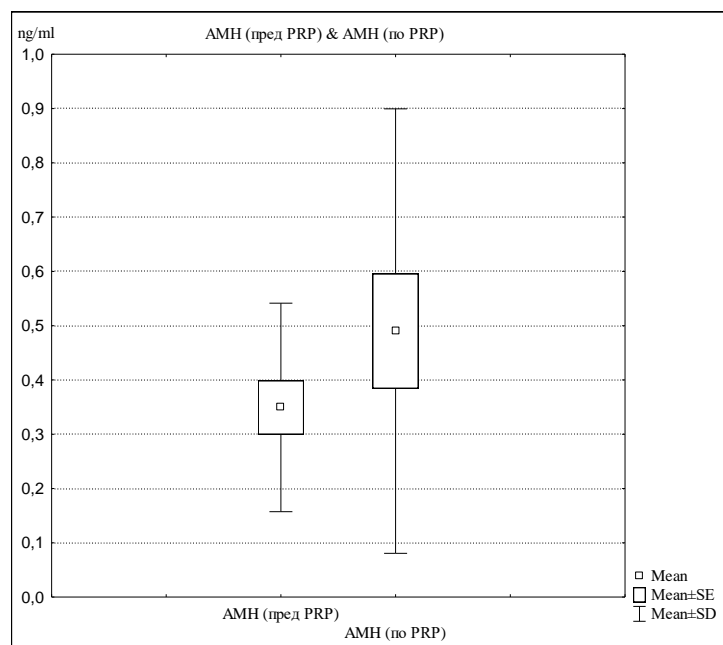
6.8.2 Разлика во вредности на AMH (пред & по давање PRP)

Разликата во вредности на AMH (пред & по давање PRP) е прикажана на табела 26 и графикон 8.

За $Z=2,29$ и $p<0,05$ ($p=0,02$) вредноста на AMH по давањето PRP значајно е поголема во однос на вредноста на AMH пред давањето PRP.

Табела 26. Разлика во вредности на АМН (пред & по давање PRP)

Pair of Variables	Valid	T	Z	p-level
АМН (пред PRP) & АМН (по PRP)	30	16,00	2,29	0,02



Графикон 8

6.8.3 Разлика во вредности на естрадиол (пред & по давање PRP)

Разликата во вредностите на естрадиол (пред & по давање PRP) е прикажана на табела 27.

За $t=2,09$ и $p>0,05$ ($p=0,06$) вредноста на естрадиол по давањето PRP незначајно е помала во однос на вредноста на естрадиол пред давањето PRP.

Табела 27. Разлика во вредности на естрадиол (пред & по давање PRP)

Variable	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv. Diff.	t	df	p
Естрадиол (пред PRP)	71,06	31,60						
Естрадиол (по PRP)	52,69	20,15	15	18,38	34,13	2,09	14	0,06

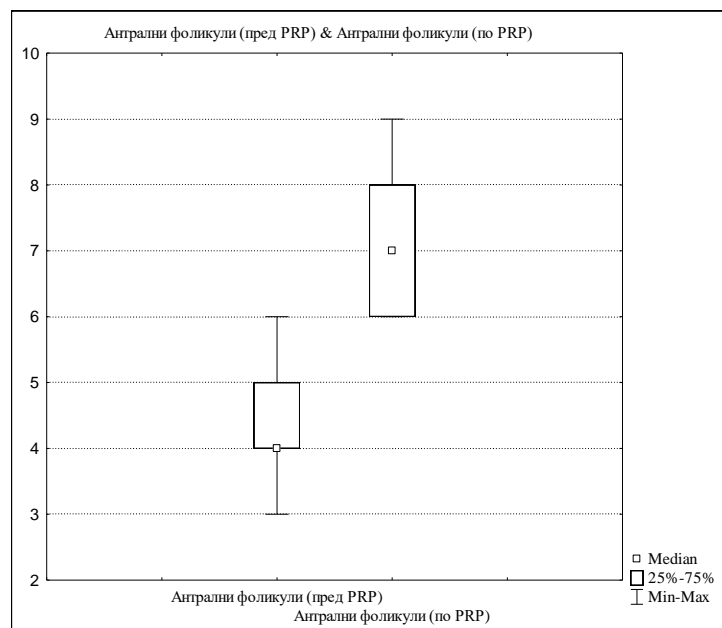
6.8.4 Разлика во бројот на антрални фоликули (пред & по давање PRP)

Разликата во бројот на антрални фоликули (пред & по давање на PRP) е прикажана на табела 28 и графикон 9.

За $Z=3,41$ и $p<0,001$ ($p=0,0007$) бројот на антрални фоликули по давањето на PRP значајно е поголем во однос на бројот на антрални фоликули пред давањето PRP.

Табела 28. Разлика во бројот на антрални фоликули (пред & по давање PRP)

Pair of Variables	Valid	T	Z	p-level
Антрални фоликули (пред PRP)&Антрални фоликули (по PRP)	30	0,00	3,41	0,0007



Графикон 9

5.9. Корелација/број на тромбоцити (PRP)

5.9.1. Број на тромбоцити (PRP) & FSH (по PRP) E2

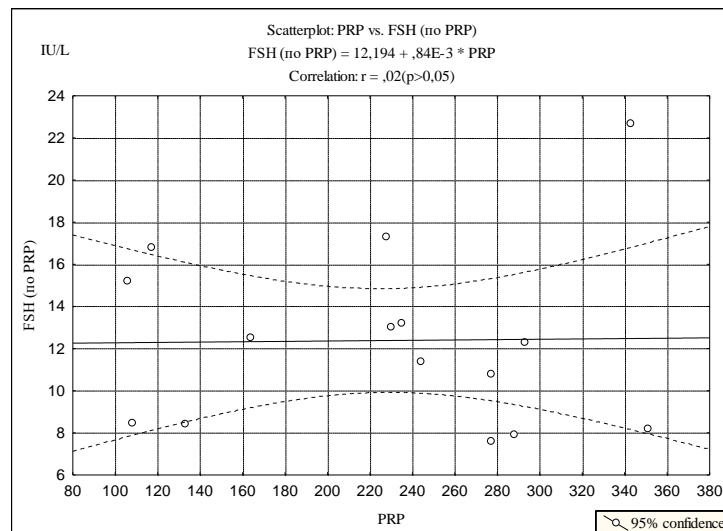
Прикажаните резултати на табела 29 се однесуваат на вредностите на естрадиол помеѓу групите.

Вредностите на естрадиол варираат во интервалот $444,53 \pm 331,87$ pmol/L, $\pm 95,00\%CI: 260,75-628,32$ pmol/L, минималната вредност изнесува 178,00 pmol/L, а максималната вредност изнесува 1475,00 pmol/L.

Табела 29. Вредности на естрадиол

Variable	N	Mean	Confidence - 95,00%	Confidence + 95,00%	Minimum	Maximum	Std.Dev.
Estradiol	30	444,53	260,75	628,32	178,00	1475,00	331,87

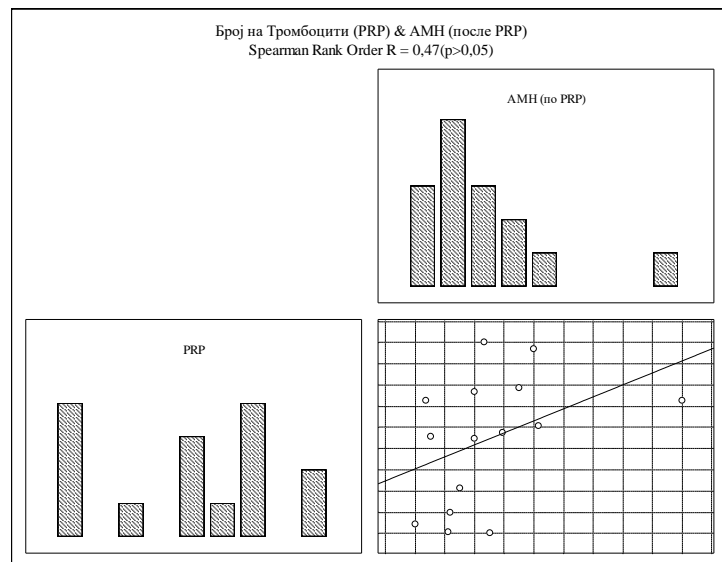
На графикон 10 е прикажана корелацијата помеѓу бројот на тромбоцити (PRP) на пациентките и вредноста на FSH по PRP. За $r = 0,02$ ($p > 0,05$) утврдена е изразено слаба позитивна незначајна корелација. Имено, со покачување на бројот на тромбоцити (PRP) на пациентките за единечна вредност ($1 / 10^9L$) вредноста на FSH по PRP (просечно) незначајно се зголемува за $0,84E-3$ IU/L.



Графикон 10

5.9.2. Број на тромбоцити (PRP) & АМН (по PRP)

На графикон 11 е прикажана корелацијата помеѓу бројот на тромбоцити (PRP) на пациентките и вредноста на FSH по PRP. За $r = 0,47$ ($p > 0,05$) е утврдена средно јака позитивна незначајна корелација. Имено, со покачување на бројот на тромбоцити (PRP) на пациентките вредноста АМН по PRP незначајно се зголемува.

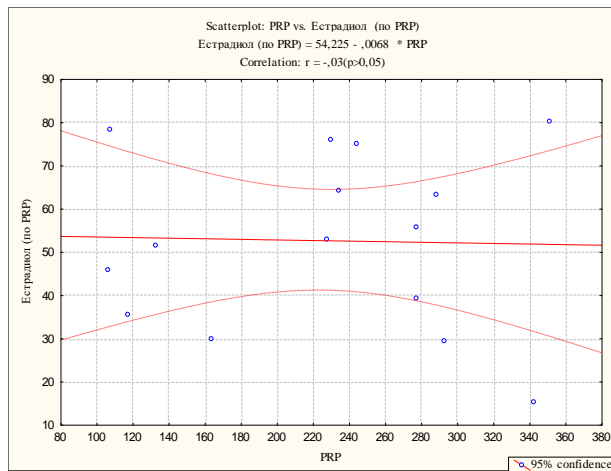


Графикон 11

5.9.3. Број на тромбоцити (PRP) & естрадиол (по PRP)

На графикон 12 е прикажана корелацијата помеѓу бројот на тромбоцити (PRP) на пациентките и вредноста на естрадиол по PRP. За $r = -0,03$ ($p > 0,05$) утврдена е изразено слаба негативна незначајна корелација. Имено, со покачување на бројот на тромбоцити (PRP) на пациентките за единечна вредност ($1 / 10^9L$) вредноста на естрадиол по PRP (просечно) незначајно се намалува за $0,007$ pmol/L.

Резултати од ин витро оплодување кај пациентки со намалени оваријални резерви по интраоваријална апликација на аутологна плазма збогатена со тромбоцити, активирана со калциум глуконат: плазма збогатена со тромбоцити перспективна терапија во иднина

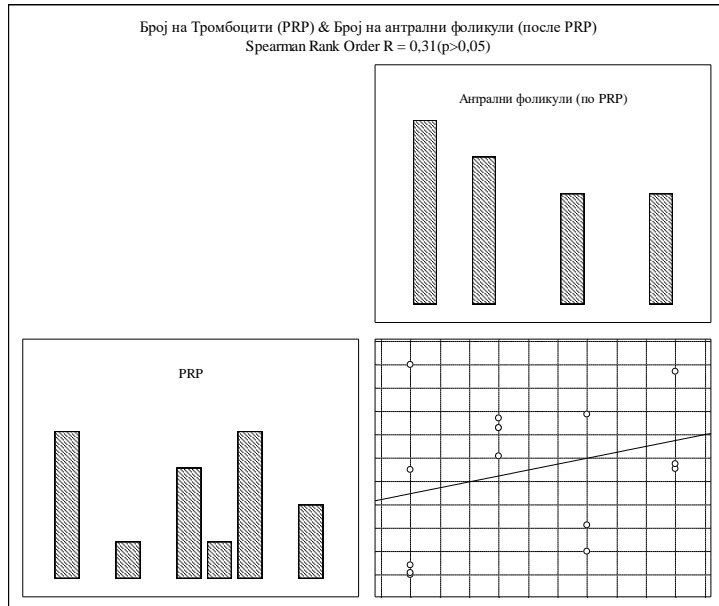


Графикон 12

5.9.4. Број на тромбоцити (PRP) & број на антрални фоликули (по PRP)

На графикон 13 е прикажана корелацијата помеѓу бројот на тромбоцити (PRP) на пациентките и бројот на антрални фоликули по PRP.

За $r = 0,31$ ($p > 0,05$) утврдена е умерено јака позитивна незначајна корелација. Имено, со покачување на бројот на тромбоцити (PRP) на пациентките, бројот на антрални фоликули по PRP незначајно се зголемува.



Графикон 13

6. ДИСКУСИЈА

Во последната деценија направени се повеќе иновативни обиди за надминување на проблемот на оваријалното стареење преку имплементација на теоријата кон нови клинички апликативни методи. Тоа подразбира воведување нови техники, како лапароскопски добиен примерок на кортикално оваријално ткиво и потоа негова автологна реимплантација на јајчниците по соодветна обработка на ткивото, односно метода на трансферирање на матични клетки во јајчниците или метода на интраоваријална апликација на PRP (74,84). Со овие нови мали чекори, секако, постигнати се повеќе успешни бремености без досега познати компликации од методите.

Во оваа студија се евалуирани првичните резултати направени во нашата земја за бенефитот од употребата на PRP како метода на лекување на оваријалниот инфертилитет кај пациентки со намалени оваријални резерви (87). Улогата на PRP во ткивната регенерација, активацијата на ангиогенезата, контролата на имунолошкиот одговор, како и зголемената миграција, диференцијација и пролиферација на одредени клетки, сè уште е недоволно проучена и објаснета. Но, теоретските сознанија доведоа до сè поголема имплементација на истата во различни медицински области. Се смета дека лекувањето на оваријалниот инфертилитет станува еден дел од нив (88).

Од посебно значење е можноста со оваа метода да се подобрат резултатите кај жени во рана менопауза, понапредната возрасна група, кај жени со намалени оваријални резерви, а кои сакаат да имаат сопствено биолошко дете. Имено, жените со дијагностицирана оваријална инсуфициенција имаат ирегуларни и неправилни менструални крвавења дури во 50% и мала можност за спонтано забременување.

Постоењето на оваа група (PORs) е демаскирано поради зголеменото прифаќање на ин витро оплодување (ИВФ) како модалитет на третман за лекување на неплодност. Се верува дека приближно 10% од жените што се подложени на ИВФ-постапка ќе покажат слаб одговор на оваријална стимулација (89). Сепак, инциденцата може да биде многу поголема кај неплодната популација бидејќи многумина остануваат недиагностицирани или не се јавиле за третман во ИВФ-центар.

Пациентите со намалени оваријални резерви се подложни на намален оваријален одговор при контролирана оваријална стимулација, висока стапка на откажани циклуси во тек на ИВФ и значајно намалување на стапката на забременување во тек на ИВФ-процесот. Понекогаш единствено решение за овие пациентки е можноста за користење донација на ооцити (86).

Сепак, употребата на PRP во третман на оваријален инфертилитет сè уште е во почетен стадиум. По забелешките на повеќе автори каде што со употребата на PRP се подобрува и функцијата на таргет-органот започнува ентузијастички употребата на PRP и кај пациентки со оваријална инсуфициенција. Тоа доведува до употребата на PRP во репродуктивната медицина првпат во 2017 година од страна на Pantos, каде што на медицинска конференција на ESHRE се објавени првичните охрабрувачки резултати (73). Следната година е објавена првата студија за интраоваријално инјектирање автологна плазма богата со тромбоцити и ефектот на PRP врз оваријалната микросредина и производство на оцити со добар квалитет (74). Притоа остануваат неодговорени повеќе прашања за механизмот на дејствување на PRP, а особено улогата на секој од факторите на раст. Останува од суштинско значење да се разбере физиолошката основа на стареењето на јајниците за да може да се интерпретираат механизмите на дејство.

Очигледно ооцитите во ткивото на јајникот почнуваат да стареат по 35-40 години, кога нивниот број и бројот на примарни фоликули почнува значително да опаѓа. Ова се должи на стопирање на фоликуларното обновување, што е предизвикано од недостиг на достапни генски гнезда на гранулоза клетки. Формирањето на нови гранулозни клетки е зависно од имунолошкиот систем. Затоа, недостигот на формирање на гранулозни клетки е последица на промените на функциите на хомеостатскиот имунолошки систем предизвикани од возраста, почнувајќи од 35-тата година. Во овој период оваријалната неплодност почнува драстично да се зголемува. Фазата на развој на примордијалниот фоликул до преовулаторен фоликул е процес кој може да трае и до 1 година. Притоа е евидентирана меѓусебната зависност и развој на сигнални врски меѓу ооцитата и соматските фоликуларни клетки, гранулоза и тека клетки, неопходни за правилен раст и развој на примордијалниот фоликул кој завршува со продуцирање на ооцита способна за фертилизација и преимплатациски развој на ембрион. Нарушувањата на кое било место на оваа меѓусебна комуникација може да доведат до прематурен оваријален инфертилитет, губење на гранулоза клетките или неконтролирана пролиферација на клетки и појава на оваријални тумори (31). Со употребата на факторите на раст присутни во тромбоцитите, англ. platelet-derived growth factors (PDGFs), се верува дека дисфункционалното оваријално ткиво се снабдува со есенцијални фактори потребни за ангиогенеза и нормална фоликуларна васкуларизација. Тоа, секако, има клучна улога во клеточното и молекуларно фоликуларно стареење. Во тој контекст неопходно е да се споменат ангиогенезата и фоликуларната васкуларизација и нивната значајна улога во стареењето на фоликулот (90).

Доминантниот фоликул кој расте зависи од перифоликуларната циркулација следена преку растот на крвните садови во тека клетките и последователно со зголемување на бројот на серумски гонадотропински рецептори. Во некои студии е потврдено зголемено ниво на васкуларниот ендотелијален фактор на раст (VEGF) во фоликуларната течност кај постари ооцити (47). Тоа се објаснува преку намалената васкуларизација што води кон хипооксија и зголемена продукција на VEGF од страна на гранулоза и тека клетките со цел да се подобри перифоликуларната циркулација. Оксидативниот стрес води кон нарушување на клеточната функција, енергетскиот метаболизам, до ослободување на поголем број електрони, што од друга страна влијае врз митохондријалната ДНК, нејзината структура и функција (48).

Дополнително присутни рецептори за фактори на раст на самите гранулоза клетки ја потврдуваат нивна поврзаност со активацискиот процес на примордијалните фоликули (46). Најважна компонента на PRP е трансформирачкиот фактор на раст од бета-фамилија (TGF beta), што игра сигнификантна улога во различни фази на развој на фоликулот. Потврда на горенаведеното е добиена и од студијата на Hosseini (90). Оваа студија го евалуира ефектот од PRP на раст и преживување на изолиран ран фоликул во три димензионален систем. Заклучокот е дека дополнителна суплементација на медиумите со PRP може да доведе до поголема вијабилност и раст на изолираните рани преантрални фоликули во ин витро услови.

Од друга страна, присуството на оваријални герминативни стем клетки на површината на оваријалното ткиво OSCs, под одредени услови, може да продуцира de novo примордијални фоликули и со само тоа и појава на нови антрални фоликули. Прашањата за технички протоколи и нивна изолација од оваријалното ткиво и постигнување на некој консензус во однос на нивното постоење може да бидат и едни од основните начела кои би помогнале во дефинирање на дозата на PRP и неговиот ефект во оваријалното ткиво. За обележување е дека само одредена фракција од OSCs во ин витро култура ја продолжува мејозата и формира ооцити. Зашто само одредена фракција која изразува експресија на Stra8 е подложена на диференцијација останува непозната (91). Алтернативно, можно е стареењето на OSCs да е резултат на промени на ДНК и тешкотии при нејзината репарација, која е идентифицирана како една од причините за стареење на ооцитите кај цицачите (92). Разјаснувањето на механизмот што доведува до стареење на OSCs може само да води кон нов третман со кој би се одложиле оваријалното стареење и инфертилитетот поврзан со возраста.

Во интерес и проширување на сознанието на улогата на PRP во третман на оваријалната инсуфициенција од огромно значење е да се

спомене и студијата на Vukovsky (31). Во оваа студија е посочена и потврдена улогата на циркулаторни моноклеарни антитела во реактивација на фоликулогенезата. Имено, оваријалните стем клетки од оваријалното ткиво се способни во одредени услови да се диференцираат во клетки со голема сличност како ооцитите (oocyte-like cells, OLCs), кои пак во ин витро услови не можат да постигната матурација и фертилизација. Докажано е дека тоа се должи на отсуството на гранулоза клетки. Од друга страна, нивната функција е тесно поврзана со присуството на моноклеарни циркулирачки клетки. Тие влијаат врз индуцирање на одредени фази на мејозата во ооцитот. Затоа тука првпат се предлага употреба на моноклеарни клетки во оваријалната рејувенација, особено зашто имунолошкиот систем има соодветна улога во диференцирање на стем клетките. Надополнување на горенаведеното се и промените на имунолошкиот систем кои го придружуваат стареењето. Секако, тоа може да отвори нови прашања за оваријална фоликуларна реактивација. Како и да е, присуството на овие стем клетки го објаснува и едниот од механизмите на дејствување на автологната плазма збогатена со тромбоцити.

Како и да е, нашите првични резултати за евалуирање на успехот од ин витро фертилизација кај пациентки каде што пред постапката за ИВФ е направена интраоваријална апликација на PRP се охрабрувачки. Притоа јасно е дека претстојат повеќе предизвици во интерпретирање на овие резултати. Еден од нив е непостоењето на стандарден протокол за оваријална стимулација на пациентки – poor responders. Неодамнешните студии демонстрираа многу мала стапка на живороденост, независно од годините и протоколот кој се користи (86). Кај оваа група пациентки кумулативната стапка на живороденост исто така драстично се намалува паралелно со зголемувањето на возраста на пациентките.

Поради тоа, во оваа студија се следени препораките за индукција на овулација назначени од Американското здружение за репродуктивна медицина. Тоа подразбира и двете групи пациентки (испитувана и контролна) да се стимулирани со блага стимулација која вклучува кломифен со мали дози на гонадотропин во антагонистички протокол.

Двете групи во студијата се избалансирани во однос на базичните карактеристики, како возраст, BMI, должина на лекување на инфертилитет, претходни ИВФ-циклуси и сл. И двете групи исполнуваат минимум два од трите критериуми зададени од страна на ESHRE, со што ги исполнуваат условите за PORs.

Ние ги мониториравме оваријалните маркери: хормонални (FSH;AMH) и функционални (AMH) пред и по интраоваријалната апликација на PRP. Студијата покажа промена во оваријалните маркери.

Притоа се детектира сигнификантна значајна статистичка разлика во вредностите на FSH и AMH. Имено, За $t=3,58$ и $p<0,01$ ($p=0,003$) вредноста на FSH по давањето PRP значајно е помала во однос на вредноста на FSH пред давањето PRP. За $z=2,29$ и $p<0,05$ ($p=0,02$) вредноста на AMH по давањето PRP значајно е поголема во однос на вредноста на AMH пред давањето PRP.

Набљудувани се и промените на антрални фоликули пред и по апликација на PRP. Забележано е статистички сигнификантно зголемување на бројот на антрални фоликули. За $Z=3,41$ и $p<0,001$ ($p=0,0007$) бројот на антрални фоликули по давањето PRP значајно е поголем во однос на бројот на антрални фоликули пред давањето PRP.

Резултатите покажаа зголемување на фертилизациона, имплантациона и клиничка бременост и стапка на живороденост на ИВФ-циклус/ембрио-трансфер во групата на пациентки каде што пред постапката за ИВФ е направена интраоваријална интракортикална апликација на аутологна плазма збогатена со тромбоцити.

Истата не покажа значајна статистичка сигнификантност со контролната група, но покажува тенденција кон зголемување на стапката на живороденост, која всушност е најважен параметар за процена на успехот на ИВФ.

7. ОГРАНИЧУВАЊЕ

Иако употребата на PRP во многу медицински гранки е докажана, прифатена и клинички се користи, за жал, сè уште недостигаат контролни мултицентрични студии кои ја користат оваа метода во третман на оваријален инфертилитет. Ограничувањата што треба да се земат предвид се големината на студијата, дизајнот, рандомизираноста и сл.

Главно ограничување на оваа студија е недостигот на претходни студии за безбедноста од употребата на PRP во третман на оваријален инфертилитет во облик на интраоваријална кортикална апликација.

Потребни се дополнителни студии и клинички истражувања во иднина кои ќе ги потврдат, верификуваат нашите резултати, а со тоа и ефикасноста од PRP во третман на оваријален инфертилитет, особено во популација на жени со намалени оваријални резерви.

8. ЗАКЛУЧОК

Беа разгледани најдобрите достапни докази за употребата на PRP во медицинска практика.

Бидејќи дијагнозата на пациенти со намалени оваријални резерви често остава ограничено време за лекување, на пациентите треба да им се даде избор за можни третмани со соодветна информативна согласност.

Начинот на добивање на PRP е едноставен, минимално инвазивен и со ниска цена. Високата концентрација на фактори на раст и цитокини во PRP во оштетеното ткиво влијае врз постигнувањето рамнотежа меѓу анаболните и катаболни процеси, оптимизирајќи ја ткивната околина и фаворизирајќи го процесот на заздравување на ткивото.

Дополнително со користење на PRP се избегнуваат разни етички, расни и генски прашања и ограничувања, како и можност за пренос на одредени инфективни заболувања.

Со оглед на отсуството на значајни несакани ефекти и достапноста на PRP како метода за оваријално подмладување, неопходни се понатамошни истражувања во блиска иднина преку кои ќе може да се докаже соодветен терапевтски потенцијал од PRP врз основа на медицина базирана на докази. На овој начин ќе може да се дефинира, правилно да се селектира најсоодветна популација на пациентки за PRP-методата и да се направат потребните истражувачки чекори за да се обезбеди адекватен бенефит од употребата на PRP како третман за лекување на оваријален инфертилитет. Нашата студија го покажа бенефитот од употребата на PRP кај пациентки со намалени оваријални резерви преку објективни промени на вредностите на оваријалните маркети придружено со зголемување на бројот на антрални фоликули, што сè заедно води до зголемување на стапката на клиничка бременост кај овие пациентки.

Секако, потребни се понатамошни истражувања и дополнителни клинички студии кои ќе ги потврдат нашите резултати. Идните студии треба да проценат дали овој пристап може да биде особено корисен кај специфична група пациенти.

Евалуацијата на оваријалните резерви и индивидуализацијата на терапевтската стратегија се најважни фактори за оптимизирање на успехот од ИВФ.

9. ИМПЛЕМЕНТАЦИЈА ВО ПРАКТИКА

Намалувањето на нивото на FSH, следено со зголемување на вредностите на АМН и зголемување на бројот на антралните фоликули по интраоваријална апликација на PRP, ја поддржува идејата за терапевтски потенцијал од употребата PRP како третман за пациентки со намалени оваријални резерви кои лекуваат оваријален инфертилитет.

Резултатите од овој труд, со акцент на позитивните ефекти од PRP, ќе дадат научен придонес во областа на репродуктивната медицина, а секако ќе имаат и одреден степен на практична и терапевска вредност во употребата на еден сосем нов третман за пациентите со намалени оваријални резерви, кои се еден од најголемите предизвици во репродуктивната медицина.

10. Преглед на литературата (REFERENCES)

1. Hull M, Glazener C, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, et al. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *BMJ*. 1985;291:1693–1697
2. European Society for Human Reproduction and Embryology. Guidelines to the prevalence, diagnosis, treatment and management of infertility, 1996. *Hum Reprod*. 1996;11:1775–1807
3. Bhattacharya S, Johnson N, Tijani HA, Hart R, Pandey S, Gibreel AF. Female infertility. *BMJ Clinical Evidence*. 2010;2010:0819.
4. Cahill DJ, Wardle PG. Management of infertility. *BMJ : British Medical Journal*. 2002;325(7354):28-32
5. Hull MGR. Fertility treatment options in women over 40 years old. In: Lobo RA, editor. *Perimenopause*. New York: Springer; 1997: 287–307
6. Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. A new model of reproductive aging: The decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod*. 2008;23:699–708.
7. Peters H. Intrauterine gonadal development. *Fertil Steril*. 1976;27:493–500.
8. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Schoemaker J, Lambalk CB. The clomiphene citrate challenge test versus the exogenous follicle-stimulating hormone ovarian reserve test as a single test for identification of low responders and hyperresponders to *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*. 2006;85:1714–22.
9. Wright VC, Chang J, Jeng G, Macaluso M. Assisted reproductive technology surveillance—United States, 2003, *MMWR Surveill Summ.*, 2006;55:1-22.
10. Padma Rekha Jirge. Poor ovarian reserve. *J Hum Reprod Sci*. 2016 Apr-Jun; 9(2): 63–69.
11. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of ‘poor response’ to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod*. 2011;26:1616–24
12. Venetis CA. The Bologna criteria for poor ovarian response: the good, the bad and the way forward. *Hum Reprod*. 2014;29:1839–41.
13. Ferraretti AP, Gianaroli L. The Bologna criteria for the definition of poor ovarian responders: is there a need for revision? *Hum Reprod*. 2014;29:1842–5.
14. Pellicer A, Ardiles G, Neuspiller F, Remohí J, Simón C, Bonilla-Musoles F. Evaluation of the ovarian reserve in young low responders with

- normal basal levels of follicle-stimulating hormone using three-dimensional ultrasonography. *Fertil Steril*. 1998;70:671–5.
15. Martinez F, Barri PN, Coroleu B, Tur R, Sorsa-Leslie T, Harris WJ, et al. Women with poor response to IVF have lowered circulating gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) bioactivity during spontaneous and stimulated cycles. *Hum Reprod*. 2002;17:634–40.
 16. Firns S, Cruzat VF, Keane KN, Joesbury KA, Lee AH, Newsholme P, et al. The effect of cigarette smoking, alcohol consumption and fruit and vegetable consumption on IVF outcomes: A review and presentation of original data. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:134.
 17. Desai SS, Roy BS, Mahale SD. Mutations and polymorphisms in FSH receptor: Functional implications in human reproduction. *Reproduction*. 2013;146:R235–48.
 18. Valentina Grisendi, Elisa Mastellari, and Antonio La Marca Ovarian Reserve Markers to Identify Poor Responders in the Context of Poseidon Classification. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10: 281.
 19. Broer SL, Van Disseldorp J, Broeze KA, Dolleman M, Opmeer BC, Bossuyt P, et al. IMPORT study group. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. *Hum Reprod Update*. 2013;19:26–36.
 20. Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil Steril*. 2011;95:170–5.
 21. Fleming R, Seifer DB, Frattarelli JL, Ruman J. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reprod Biomed Online*. 2015;31:486–96.
 22. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, Taieb J. Anti-Mullerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization, *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:1796-1802.
 23. Fertility in women of late reproductive age: the role of serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels in its assessment *J Endocrinol Invest*. 2016; 39(11): 1259–1265.
 24. Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW, te Velde ER, Broekmans FJ. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril*. 2007;87:764–75.
 25. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Human Reprod Update*. 2006;12:685–718.

26. Kedem A, Haas J, Geva LL, Yerushalmi G, Gilboa Y, Kanety H, et al. Ongoing pregnancy rates in women with low and extremely low AMH levels. A multivariate analysis of 769 cycles. PLoS One. 2013;8:e81629.
27. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing, Hum Reprod Update. 2002;8:141-154.
28. Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends, Trends Endocrinol Metab. 2007;18:58-65.
29. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary, Nature. 2004;428: 145-150.
30. Pangas SA. Growth factors in ovarian development, Semin Reprod Med. 2007; 25:225-234.
31. Antonin Bukovsky. Novel methods of treating ovarian infertility in older and POF women, testicular infertility, and other human functional diseases. Reprod Biol Endocrinol. 2015; 13: 10.
32. Hamet P, Tremblay J. Genes of aging, Metabolism. 2003;52:5-9.
33. Yin D, Chen K. The essential mechanisms of aging: Irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions, Exp Gerontol. 2005;40:455-465.
34. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction, Reprod Biol Endocrinol. 2005;3:28.
35. Carla Tatone, Fernanda Amicarelli, Maria Cristina, Carbone Patrizia, Monteleone Donatella, Caserta Roberto, Marci Paolo, Giovanni Artini, Paola Piomboni, Riccardo Focarelli. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. Hum Reprod. 2008;14:131–142.
36. Tatone C, Carbone MC, Di Cola M, Marci R, Amicarelli F. Possible role of carbonyl stress in ovarian aging, Hum Reprod. 2007;22:i75.
37. de Bruin JP, Dorland M, Spek ER, Posthuma G, van Haaften M, Looman CW, te Velde ER. Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries, Biol Reprod. 2004; 70 : 419-424.
38. Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, Groome NP, Themmen AP, Visser JA. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice, Endocrinology. 2006; 147:3228-3234.
39. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, Taieb J. Anti-Mullerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization, J Clin Endocrinol Metab. 2007;92 :1796-1802.

40. Fertility in women of late reproductive age: the role of serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels in its assessment J Endocrinol Invest. 2016; 39(11): 1259–1265.
41. Steuerwald NM, Bermudez MG, Wells D, Munne S, Cohen J. Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes, Reprod Biomed Online. 2007;14: 700-708.
42. Takeuchi T, Neri QV, Katagiri Y, Rosenwaks Z, Palermo GD. Effect of treating induced mitochondrial damage on embryonic development and epigenesis, Biol Reprod . 2005;72:584-592.
43. Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttenn F, Ritvos O, Aittomaki K, Bourcigaux N, Jacquesson L, Bouchard P, Frydman R, et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure, Eur J Endocrinol. 2006;154: 739-744.
44. Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarty B, Singh L. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure, Hum Genet. 2006; 119: 408-415.
45. Cukurcam S, Betzendahl I, Michel G, Vogt E, Hegele-Hartung C, Lindenthal B, Eichenlaub-Ritter U. Influence of follicular fluid meiosis-activating sterol on aneuploidy rate and precocious chromatid segregation in aged mouse oocytes, Hum Reprod. 2007;22: 815-828.
46. Costello MF, Shrestha SM, Sjoblom P, McNally G, Bennett MJ, Steigrad SJ, Hughes GJ. Power doppler ultrasound assessment of the relationship between age and ovarian perfollicular blood flow in women undergoing in vitro fertilization treatment, J Assist Reprod Genet. 2006;23:359-365.
47. Artini PG, Monti M, Cristello F, Matteucci C, Bruno S, Valentino V, Genazzani AR. Vascular endothelial growth factor in females of reproductive age, Gynecol Endocrinol. 2003; 17: 477-492.
48. Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging, Exp Biol Med (Maywood). 2002;227:671-682.
49. Linton S, Davies MJ, Dean RT. Protein oxidation and ageing, Exp Gerontol. 2001;36:1503-1518.
50. Johnson J, Canning J, Kaneko T, James K. Pru, Jonathan L. Tilly. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature. 2004; 428, 145–150.
51. Wisser A, Gonen O, Ghetler Y, Shavit T, Berkovitz A, Shulman A: Addition of dehydroepiandrosterone for poor responder patients before and during IVF treatment improves the pregnancy rate: a randomized prospective study. Hum Reprod 2010, 25: 2496-2500
52. dehydroepiandrosterone

53. Pitteloud N, Mootha VK, Dwyer AA, Hardin M, Lee H, Eriksson KF, Tripathy D, Yialamas M, Groop L, Elahi D, Hayes FJ: Relationship between testosterone levels, insulin sensitivity, and mitochondrial function in men. *Diabetes Care* 2005;28:1636-1642.
54. Duffy JM, Ahmad G, Mohiyiddeen L, Nardo LG, Watson A. Growth hormone for *in vitro* fertilization. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;20(1).
55. Siristatidis C, Vogiatzi P, Bettocchi S, Basios G, Mastorakos G, Vrachnis N. Transvaginal ovarian trauma, poor responders and improvement of success rates in IVF: anecdotal data and a hypothesis. *Med Hypothesis* 2014; 83: 227-231
56. Wikipedia. Three-parent baby. Wikipedia, The free encyclopedia 2014; http://en.wikipedia.org/wiki/Three-parent_baby.
57. Conley CL. Hemostasis. In: Mountcastle VB, editor. *Medical Physiology*. St. Louis: The C.V. Mosby Company; 2004. p. 1137-46
58. Cole BJ, Seroyer ST, Filardo G, Bajaj S, Fortier LA. Platelet-rich plasma: Where are we now and where are we going? *Sports Health* 2010; 2:203-10.
59. Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E. Platelet-rich fibrin: Evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res* 2008;19:42-6
60. Y. Zhu, M. Yuan, H. Y. Meng et al., "Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 21, no. 11, pp. 1627–1637, 2013.
61. S. Harrison, P. Vavken, S. Kevy, M. Jacobson, D. Zurakowski, and M. M. Murray, "Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines," *The American Journal of Sports Medicine*. 2011;39(4): 729–734.
62. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: From pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* 2009;27:158-67.
63. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, et al. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: Platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13:1131-7.
64. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Corrêa do Amaral RJ, Granjeiro JM, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: Optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:67.

65. Perez AG, Lana JF, Rodrigues AA, Luzo AC, Belangero WD, Santana MH. Relevant aspects of centrifugation step in the preparation of platelet-rich plasma. *ISRN Hematol* 2014;2014:176060
66. Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Klüter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31:615-619.
67. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004;34:665-671.
68. S. P. Arnoczky, D. Delos, and S. A. Rodeo, "What is platelet-rich plasma?" *Operative Techniques in Sports Medicine*. 2011; 19(3):142–148.
69. Kellie K. Middleton, MPH, Victor Barro, Bart Muller, Satosha Terada, and Freddie H. Fu. Evaluation of the Effects of Platelet-Rich Plasma (PRP) Therapy Involved in the Healing of Sports-Related Soft Tissue Injuries. *Orthop J*. 2012; 32: 150–163.
70. Arshdeep, Kumaran M S. Platelet -rich plasma in dermatology; Bone or a bane? *Indian J Dermatol, Venereol and Leprol* 2014; 80: 5-14.
71. Roubelakis MG, Trohatou O, Roubelakis A, et al. Platelet-rich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. *Stem cell reviews*. 2014;10:417–28.
72. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, et al. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. *PloS one*. 2014;9:e104662
73. K, Nitsos N, Kokkali G, et al. Ovarian rejuvenation and folliculogenesis reactivation in perimenopausal women after autologous platelet-rich plasma treatment. Abstracts, ESHRE 32nd Annual Meeting; 3-6 Jul 2016; Helsinki, Finland. *Hum Reprod* 2016 (Suppl. 1): i301
74. E. Scott Sills, Natalie S. Rickers, Xiang Li, Gianpiero D. Palermo. First data on in vitro fertilization and blastocyst formation after intraovarian injection of calcium gluconate-activated autologous platelet rich plasma. *Gynecological Endocrinology* 2018; 34: 756-760.
75. Szafarowska M, Jerzak M. Ovarian aging and infertility. *Ginekol Pol* 2013; 84: 298-304.
76. Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, Masoodi M, Nicolaou A, Baan C, Dahlke MH. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(12):1496–1500
77. Eva Rubio-Azpeitia, Isabel Andia. Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014 Jan-Mar; 4(1): 52–62.

78. Andia I, Sánchez M, Maffulli N. Basic science: Molecular and biological aspects of PRP therapies. *Operative Techniques in Orthopedics*. 2012;22: 3–9.
79. Andia I, Maffulli N. Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(12):721–730.
80. Castegnaro S, Chierigato K, Maddalena M, et al. Effect of platelet lysate on the functional and molecular characteristics of mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2011;6(2):105–114
81. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol*. 2007;211(1):121–130
82. Platelet Rich Plasma (PRP) Guidelines, © International Cellular Medicine Society - 2011. Available from: <http://www.cellmedicinesociety.org>.
83. Lohmann M, Walenda G, Hemeda H, et al. Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e37839.
84. Kawamura K, Chen Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho CH, Kawamura N, Tamura M, Hasimoto S, suglishita Y, Morimoto Y, Hosoi Y, Yousioka N, Ishizuka B, Hsueh AJ. Hippo signaling disruption and AKT stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 17474-9.
85. World Health Organization WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (5th ed.), WHO Press, Geneva, Switzerland 2010.
86. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Comparison of pregnancy rates for poor responders using IVF with mild ovarian stimulation versus conventional IVF: a guideline. *Fertility and Sterility*. June 2018, Volume 109, Issue 6, Pages 993–999
87. Snezhana Stojkowska, Gligor Dimitrov, Zoran Petanovski, Damjan Shushleski, Stefan Saltirovski, Vladimir Matevski, Makuli Hadzi Lega, Valentina sotirovka, Daniela Stojanovska, Nikoleta Stamenkovska, Emilija Petanovska I Rina Latifi Isaki. “Novel method of treating ovarian infertility: is Platelet-Rich Plasma a new promising therapy in the future?”, *Mac. Med. Preview*, 2019; 73 (2); 101-106.
88. Snezhana Stojkowska, Gligor Dimitrov, Stefan Saltirovski, Konstatin Pantos, Makuli Hadzi Lega. “Autologous platelet rich plasma intracortical ovarian injection restored ovarian function and

folliculogenesis in poor responders after one month: a control pilot study,, Medicus Vol.25 (1) 7-11

89. Xu B, Chen Y, Geerts D, Yue J, Li Z, Zhu G, Jin L. Cumulative live birth rates in more than 3,000 patients with poor ovarian response: a 15-year survey of final in vitro fertilization outcome. Fertil Steril. 2018 Jun;109(6):1051-1059.
90. Hosseini L, Shirazi A, Naderi MM, Shams-Esfandbadi N, Borijan Boroujeni S, Sarvari A, Sadeghnia S, Behyadi B, Akhondi MM. Platelet-rich plasma promotes the development of isolated human primordial and primary follicles to the preantral stage. Reprod Biomed Online. 2017;35(4):343-350.
91. Jonathan L. Tilly and David A. Sinclair. Germine energetics, aging and female infertility. Cell Metab. 2013;17 (6):835-850.
92. Neha Garg and David A. Sinclair. Oogonial stem cells as a model to study age-associated infertility in women. Reproduction, Fertility and Development 2015; 27(6): 969-74.