

# Usporedba fiksnoga i fleksibilnoga antagonističkoga protokola stimulacije ovulacije u postupcima izvantjelesne oplodnje žena sa slabim ovarijskim odgovorom

---

Pitner, Iva

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:447043>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Iva Pitner**

**Usporedba fiksnoga i fleksibilnoga  
antagonističkoga protokola stimulacije  
ovulacije u postupcima izvantjelesne  
oplodnje žena sa slabim ovarijskim  
odgovorom**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2023.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Iva Pitner**

**Usporedba fiksnog i fleksibilnog  
antagonističkog protokola stimulacije  
ovulacije u postupcima izvantjelesne  
oplodnje žena sa slabim ovarijskom  
odgovorom**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2023.**

Disertacija je izrađena u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Klinici za ženske bolesti i porodništvo Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Marina Šprem Goldštajn

Su-mentor: prof.dr.sc. Krunoslav Kuna

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Marini Šprem Goldštajn na nesebičnoj potpori, velikoj pomoći, strpljenju i savjetima tijekom doktorskog studija i istraživanja. Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za Humanu reprodukciju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice na ljubaznosti i susretljivosti prilikom prikupljanja ispitanica i uzoraka za ovo istraživanje.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Stimulacija ovulacije .....	3
1.2. Ovarijska rezerva i markeri ovarijske rezerve .....	5
1.2.1. FSH i estradiol (E2).....	6
1.2.2. Inhibin B.....	7
1.2.3. Anti-Müllerov hormon (AMH) .....	7
1.2.4. Broj antralnih folikula (AFC) i volumen jajnika .....	8
1.3. Odgovor jajnika na stimulaciju ovulacije.....	8
1.3.1. Slab ovarijski odgovor na stimulaciju ovulacije.....	9
<b>2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA</b> .....	19
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	20
<b>4. ISPITANICE I METODE</b> .....	21
4.1. Ispitanice .....	21
4.2. Kriteriji isključenja.....	22
4.3. Parametri i ishodi.....	23
4.4. Odabir protokola i praćenje ispitanica za vrijeme stimulacije ovulacije .....	24
4.5. Prikupljanje uzoraka i obrada krvi .....	24
4.6. Aspiracija folikula .....	25
4.7. Embrio transfer.....	25
4.8. Statističke metode.....	25
<b>5. REZULTATI</b> .....	27
5.1. Postupak stimulacije ovulacije .....	31
5.2. Praćenje razine hormona u postupku stimulacije ovulacije.....	34
5.3. Ishodi postupka MPO .....	51
5.4. Analiza podskupina prema vrsti GnRH antagonističkog protokola i statusa ostvarene trudnoće.....	54
<b>6. RASPRAVA</b> .....	65
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	81
<b>8. SAŽETAK</b> .....	83
<b>9. SUMMARY</b> .....	84
<b>10. LITERATURA</b> .....	85
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	117

## POPIS KRATICA I OZNAKA

AFC – broj antralnih folikula (*engl. Antral Follicle Count*)

AMH – anti-Müllerov hormon

ASRM – Američko društvo za reproduktivnu medicinu

BMI – indeks tjelesne mase (*engl. Body Mass Indeks*)

CI – interval pouzdanosti

CMIA – *engl. Chemiluminescent Micropeptide Immunoassay*

DHEA – dihidroepiandrosteron

DOR - *engl. diminished ovarian reserve*

E2- estradiol

ESHRE – Europsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju

FSH – folikulostimulirajući hormon

GIFT - *engl. gamete intrafallopian transfer*

GnRH- gonadotropin - oslobađajući hormon

hCG – humani korionski gonadotropin

hMG – humani menopauzalni gonadotropin

ICSI – *engl. intracytoplasmic sperm injection*

IGF-1- Inzulinski faktor rasta 1

ITI – intratubarna inseminacija (*engl. intratubal insemination*)

IUI – intrauterina inseminacija (*engl. intrauterine insemination*)

IVF – in vitro fertilizacija

LH – luteinizirajući hormon

MPO – medicinski potpomognuta oplodnja

OHSS – sindrom ovarijske hiperstimulacije (*engl. ovarian hyperstimulation syndrome*)

OS – ovarijska stimulacija

P – razina statističke značajnosti

P4 – progesteron

PCOS – policistični ovarijski sindrom (*engl. polycystic ovary syndrome*)

POF - *engl. premature ovarian failure*

POI – prijevremena ovarijska insuficijencija (*engl. premature ovarian failure*)

POR - *engl. poor ovarian response*

PRL – prolaktin

PRP – plazma bogata trombocitima (*engl. platelet rich plasma*)

ROC – *engl. Receiver Operating Characteristics analysis*

RR – relativni rizik

TSH -tiroidni stimulirajući hormon

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organization*)

ZIFT - *engl. zygote intrafallopian transfer*

## 1. UVOD

Neplodnost definiramo kao nemogućnost spontanog zanošenja uz redovite nezaštićene spolne odnose u trajanju od jedne godine (1). Ukoliko ne dođe do začeća adekvatnu dijagnostiku trebalo bi provesti nakon jedne godine u žena mlađih od 35 godina, odnosno nakon šest mjeseci u žena starijih od 35 godina. Kod pacijentica sa poznatim rizičnim čimbenicima dijagnosticiranje i liječenje trebalo bi započeti i ranije (2).

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), jedna od šest osoba diljem svijeta je neplodna. Autori meta-analize i sistematiziranog pregleda literature, koji su analizirali više od stotinu studija o prevalenciji neplodnosti tijekom proteklih dvadeset godina, ističu da je učestalost neplodnosti 17,5% (3). Ova meta analiza obuhvatila je sve WHO regije (Amerika, Afrika, Jugoistočna Azija, Europa, Istočni Mediteran i Zapadna Pacifik). Između 1990. i 2010. godine, razina primarne i sekundarne neplodnosti se mijenjale u većini svjetskih regija. Izuzeci su bili subsaharska Afrika i Južna Azija gdje se prevalencija primarne neplodnosti smanjila tijekom dvadesetogodišnjeg razdoblja. Smanjenje želje za rađanjem djece znači, da čak i ako se prevalencija neplodnosti među onima koji su izloženi riziku trudnoće nije promijenila, manji postotak parova ima problema s neplodnošću jer manje parova nastoji imati dijete. Međutim, apsolutni broj parova s neplodnošću povećao se zbog rasta stanovništva. Sve kasnija želja za reprodukcijom također može povećati prevalenciju neplodnosti, jer sposobnost za začeće pada s kronološkom dobi. Prosječna dob prvog poroda i prosječna dob rađanja djece povećala se u svim razvijenim zemljama od 1990-ih godina (4).

Udio muškog i ženskog faktora otprilike je podjednak i iznosi 30-35%, dok je učestalost idiopatske neplodnosti 10-12%. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji najčešći poznati uzroci ženske neplodnosti, koji čine 81% svih uzroka, su poremećaji ovulacije (25%), endometrioza (15%), adhezije u zdjelici (12%), okluzija jajovoda (11%), anomalije jajovoda (11%) i hiperprolaktinemija (7%) (5). Osim navedenih, miomi maternice, adenomioza, unutar maternične adhezije, polipi endometrija, urođene anomalije Mullerove cijevi i stenoza cervikalnog kanala čine rijetke uzroke neplodnosti. Danas se sve više suočavamo s problemom neplodnosti uzrokovanom starenjem jajnika i smanjenjem rezerve jajnika zbog odgađanja trudnoće za kasniju životnu dob. Smanjena ovarijska rezerva (*engl. Diminished Ovarian Reserve - DOR*) karakterizira smanjenje broja i kvalitete jajnih stanica. Ovo je fiziološki proces koji se javlja kod svih žena, posebice nakon 45. godine života (6). Međutim, smanjenje rezerve



jajnika može se dogoditi i u ranijoj životnoj dobi. Nedavne procjene Američkog nacionalnog društva za potpomognutu reproduktivnu tehnologiju (*engl. Society for Assisted Reproductive Technology, SART*) pokazuju da je 32% ciklusa in vitro oplodnje povezano s dijagnozom DOR-a (7). Američko društvo za reproduktivnu medicinu (ASRM) ističe nedostatak jedinstvene definicije smanjene ovarijske rezerve (1). U kliničkoj praksi, smanjena ovarijska rezerva često se definira na temelju abnormalnih testova ovarijske rezerve, kao što su povišene razine FSH, niski AMH i niski AFC ili, rjeđe, neuspjeli test izazova klomifen citratom, kod žena koje još uvijek imaju redovite menstruacijske cikluse (8–10). Prijevremeni prestanak rada jajnika (*engl. Premature ovarian failure - POF*), ili kako se danas češće naziva, prijevremena ovarijska insuficijencija (*engl. Premature Ovarian Insufficiency - POI*), karakterizira postmenopauzalnu razinu FSH (> 40 IU/L), četiri ili više mjeseci sekundarne amenoreje, te dob mlada od 40 godina (11). Slab odgovor jajnika na stimulaciju ovulacije (*engl. Poor Ovarian Response - POR*) označava slab odgovor jajnika na standardnu stimulaciju ovulacije. Važno je napomenuti da, iako se uzroci ovih stanja često preklapaju, smanjena ovarijska rezerva nije isto što i slab odgovor jajnika na stimulaciju ovulacije (8).

Medicinski potpomognuta oplodnja (MPO) skup je postupaka čiji je cilj rađanje zdravog djeteta. Obuhvaća sve metode liječenja kojima se pomaže da dođe do oplodnje i trudnoće. Metode MPO-a su:

- intrauterina inseminacija (*engl. intrauterine insemination, IUI*) , intratubarna inseminacija (*engl. intratubar insemination, ITI*) - homolognim sjemenom ili sjemenom darivatelja
- izvantjelesna oplodnja (*engl. in vitro fertilization, IVF*)
- intracitoplazmatska mikroinjekcija spermija (*engl. intracytoplasmic sperm injection, ICSI*)
- prijenos gameta ili zigota u jajovod (*engl. gamete - zygote intrafallopian transfer- GIFT, ZIFT*).

Na uspješnost MPO-a utječe niz čimbenika poput majčine dobi, ovarijske rezerve i uspjeha ovarijske stimulacije, pridruženih sistemskih bolesti, stila života, genetskog materijala i muškog čimbenika.

Stimulacija ovulacije je postupak koji se koristi u postupcima izvantjelesne oplodnje kako bi se povećao broj jajnih stanica koje se mogu oploditi. Razlikuje se od indukcije ovulacije, koja se koristi za stimuliranje ovulacije u žena koje ne ovuliraju uopće ili ne ovuliraju

redovito. Individualnim pristupom odabire se najprikladniji način ovarijske stimulacije, koja je temelj uspjeha potpomognute oplodnje. Cilj medicinski potpomognute oplodnje jest postići razvoj što većeg broja kvalitetnih jajnih stanica, a potom i embrija sa najboljim implantacijskim potencijalom (5).

Slab odgovor jajnika na stimulaciju ovulacije predstavlja poseban problem u postupcima IVF-a jer je u ovih žena ishod postupka značajno snižen. Danas, zbog sve kasnije želje za reprodukcijom, raste broj žena sa slabim ovarijskim odgovorom, a smatra se da će taj postotak biti s vremenom sve veći. Stoga postoji povećana potreba za pronalaženjem protokola stimulacije ovulacije koji bi poboljšao ishod u ovoj skupini pacijentica.

U našem istraživanju pokušali smo odgovoriti na pitanje koji je optimalan protokol stimulacije ovulacije u skupini pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom na stimulaciju ovulacije.

### 1.1. Stimulacija ovulacije

Stimulacija ovulacije ključna je komponenta u postupcima medicinski potpomognute oplodnje koja je promijenila kliničku praksu od prirodnih ciklusa s jednim folikulom do stimuliranih ciklusa s višestrukim folikulima. Povećanje broja folikula, a posljedično i broja prikupljenih oocita, poboljšalo je stopu trudnoće kod žena u postupku izvanmaterne oplodnje, ne samo povećanjem broja dostupnih embrija, već i omogućavanjem produljene kulture embrija i odabirom najkvalitetnijeg embrija za transfer u maternicu (12). U postupku stimulacije ovulacije mogu se koristiti peroralni lijekovi poput klomifen citrata ili inhibitora aromataze, ali najčešći oblik stimulacije ovulacije čini parenteralna primjena gonadotropina. Gonadotropini se primjenjuju u obliku visoko pročišćenih urinarnih gonadotropina - urinarni folikulostimulirajući hormon (FSH) i humani menopauzalni gonadotropin (hMG), te kao rekombinantni gonadotropini - rekombinantni FSH i rekombinantni luteinizirajući hormon (LH). Međutim, rast većeg broja folikula u stimuliranom ciklusu može dovesti do prijevremenog porasta endogenog LH, što može imati negativni utjecaj na kvalitetu oocita te smanjiti šansu za postizanje trudnoće. Kako bi se spriječio prijevremeni porast LH, koriste se agonisti ili antagonisti gonadotropin-oslobađajućeg hormona (*engl. gonadotropin-releasing hormone - GnRH*).

Za završno sazrijevanje oocita i određivanje vremena aspiracije koriste se urinarni ili rekombinantni humani korionski gonadotropin (*engl. human chorionic gonadotropin, hCG*), ili u slučajevima rizika razvoja sindroma hiperstimulacije jajnika (OHSS, *engl. Ovarian Hyperstimulation Syndrome*), GnRH-agonisti.

Od 1990-ih godina, primjena GnRH antagonista u kliničkoj praksi uvodi se s ciljem poboljšanja rezultata izvantjelesne oplodnje i sprječavanja prijevremenog porasta luteinizirajućeg hormona (13). U pacijentica sa normalnim ovarijskim odgovorom, provedene su brojne studije koje uspoređuju rezultate primjene GnRH agonista s GnRH antagonistima. Al-Inany i suradnici su u sistematiziranom pregledu literature, u neselekcioniranoj skupini pacijentica, analizirali su djelotvornost i sigurnost primjene GnRH antagonista u usporedbi s donedavno češće korištenim protokolom koji je podrazumijevao primjenu GnRH agonista. U pregledu literature pronađena su 73 randomizirana kontrolirana klinička pokusa koja su uključivala 12.212 žena liječenih postupcima MPO-a. Skupina ispitivanih pacijentica randomizirana je u grupu kod koje se primjenjivao GnRH agonist ili GnRH antagonist. U tim studijama, nije pronađena statistički značajna razlika između dvije skupine u postotku trudnoća kao ni u postotku živorođene djece (29% uz primjenu GnRH agonista naspram 25-33% uz primjenu GnRH antagonista). Iako nije bilo dokaza o razlici između dvije skupine u postotku živorođene djece, učestalost ovarijskog hiperstimulacijskog sindroma pokazala se značajno većom nakon terapije GnRH agonistima u usporedbi s GnRH antagonistima. Dokazi ukazuju da je rizik razvoja OHSS-a nakon uzimanja GnRH agonista 11%, a nakon uzimanja GnRH antagonista između 6% i 9% (14). Istraživanja provedena na skupini pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom, iako manja u broju, također su provedena, i rezultati isto tako ukazuju na nedostatak razlika u ishodu postupka kod primjene GnRH agonista u usporedbi s antagonistima (15–20).

Terapija GnRH agonistima može uzrokovati nuspojave zbog manjka estrogena kao što su naleti vrućine, poremećaji sna i glavobolje, a također može dovesti do dugotrajne down-regulacije hipofize. S druge strane, GnRH antagonisti djeluju izravno i brzo na hipofizu, blokirajući receptore za GnRH i tako inhibirajući lučenje FSH i LH. Za razliku od agonista, antagonisti nemaju anti-estrogenske nuspojave, što ih čini pogodnijim za primjenu. Antagonisti se mogu primjenjivati u bilo kojoj fazi folikularne stimulacije i omogućavaju precizniju kontrolu nad rastom folikula (21).

Dva su glavna načina primjene antagonista: prvi je fiksni protokol u kojemu se antagonisti uvode šesti dan stimulacije ovulacije, a drugi je fleksibilni protokol kod kojeg se antagonisti

primjenjuju ovisno o karakteristikama konkretnog ciklusa, a pri čemu se najčešće gleda promjer folikula (13-14 mm). Dosadašnji rezultati studija koji su uspoređivali ta dva protokola nisu jednoznačni (22–24). Većina istraživanja odnosila su se na smanjivanje količine upotrijebljenih antagonista po ciklusu, a manje je pozornosti bilo usmjereno na problematiku preranog porasta LH odnosno povećanje efikasnosti ishoda IVF postupka (23). Različita su mišljenja kada započeti primjenu antagonista u fleksibilnom protokolu i ona nisu standardizirana. Upotrebljavaju se različiti kriteriji koji uključuju dan ciklusa, veličinu vodećeg folikula i razinu estradiola, s time da unutar istih kriterija ne postoji suglasje (23,25).

Obzirom da najnoviji dokazi govore da su poremećena razina progesterona (P4) i estradiola (E2) povezane sa lošim ishodom trudnoća, određivanje profila hormona u ciklusu stimulacije moglo bi biti od koristi (26,27). U studiji Schumachera i suradnika dokazano je da je razina estrogena na dan početka terapije GnRH antagonistima nezavisan prediktor ishoda postupka izvantjelesne oplodnje. Kod razine E2 manje od 300 pg/mL ili veće od 1100 pg/mL, postotak kliničkih trudnoća smanjen je za 40% (25).

Do sada još nisu provedena istraživanja koja bi dala jasan odgovor da li primijeniti fiksni ili fleksibilni antagonistički protokol u pacijentica sa smanjenim ovarijskim odgovorom.

Iako postoje studije koje povezuju razinu estrogena, progesterona i LH sa uspješnošću MPO postupka, pacijentice sa slabim ovarijskim odgovorom čine posebnu skupinu u kojih se dodatna istraživanja tek moraju provesti.

## 1.2. Ovarijska rezerva i markeri ovarijske rezerve

Ovarijska rezerva je pojam kojim opisujemo zalihu jajnih stanica odnosno folikula u jajniku te koja označava funkcionalni kapacitet jajnika, a ujedno služi i kao prediktor odgovora jajnika na stimulaciju ovulacije primjenom egzogenih gonadotropina. Broj jajnih stanica kod žene je najviši pri rođenju, kada iznosi oko šest do sedam milijuna. Međutim, tijekom života broj i kvaliteta jajnih stanica se konstantno smanjuju. Dob je najznačajniji faktor u smanjenju ovarijske rezerve (28). Osim dobi na smanjenje ovarijske rezerve utječu razne ginekološke bolesti, poput endometrioze, benigne i maligne neoplazije jajnika, primjena gonadotoksičnih lijekova (29,30), autoimune bolesti (28,29), kromosomski i genetski poremećaji (28,29,31–34), metabolički poremećaji i deficiti enzima (29,35,36), te upalne bolesti (28,29,31,33,35). Kod

određenog broja žena dolazi do prijevremenog smanjenja ovarijske rezerve zbog nepoznatog uzroka, što se javlja u otprilike 50% slučajeva (28). Žene sa smanjenom rezervom jajnika predstavljaju glavni rizični čimbenik za slabi odgovor na stimulaciju ovulacije unatoč visokoj dozi primijenjenih gonadotropina po broju dobivenih folikula, oocita te niskim razinama estradiola (37).

Kao markere ovarijske rezerve većina kliničara koristi broj antralnih folikula (*engl. antral follicle count*, AFC) i anti-Müllerov hormon (AMH). Uz navedene, pokazatelji ovarijske rezerve su i koncentracija FSH, E2 i inhibina B.

### 1.2.1. FSH i estradiol (E2)

Jedan od najranijih pokazatelja smanjenog rada jajnika je povišena razina FSH mjerena u ranoj folikularnoj fazi, točnije između drugog i četvrtog dana menstruacijskog ciklusa. Smanjenjem ovarijske rezerve dolazi do pada razine estradiola i smanjenja broja oocita dobivenih stimulacijom, a time i mogućnosti trudnoće (38–40). Smatra se da je razina FSH veća od 10 IU/L (10-20 IU/L) prediktor lošeg odgovora jajnika na stimulaciju ovulacije i to uz visoku specifičnost (80-100%), ali nisku senzitivnost, od svega 10-30% (41). Upravo zbog toga, kao i zbog velikih razlika za vrijeme menstrualnog ciklusa te razlika u mjerenjima između pojedinih ispitanica, određivanje koncentracije FSH kao testa probira u procjeni ovarijske rezerve ima limitirajuću ulogu. Dokazano je da su povišene koncentracije FSH iznad 10 IU/L, izmjerene u više navrata, povezane sa lošijom prognozom u procesu potpomognute oplodnje, međutim jednom izmjerena povišena razina FSH nema visoku specifičnost u predikciji lošeg odgovora na stimulaciju ovulacije ili na postizanje trudnoće (42). Serijsko određivanje FSH, kako bi se odredio idealni ciklus za početak stimulacije ovulacije u žena kod kojih se razina FSH razlikuje od ciklusa do ciklusa, prema nekim studijama, ne poboljšava ishode (43,44).

Razina bazalnog estradiola, ukoliko se koristi kao jedini mjerni pokazatelj, ima malu vrijednost kao prognostički čimbenik stimulacije ovulacije, međutim kada se koristi zajedno sa koncentracijom FSH može pomoći u interpretaciji rezultata (45,46). Povišena razina E2 u folikularnoj fazi, što se uočava kod žena s uznapredovalim reproduktivnim starenjem, ukazuje na ubrzan razvoj folikula i ranu selekciju dominantnog folikula. Povišena koncentracija estradiola povratnom spregom dovodi do snižavanja FSH što može zamaskirati stvarne povišene vrijednosti FSH. Kada je razina FSH unutar normalnog raspona, ali je koncentracija

E2 povišena, iznad 60 do 80 pg/mL, vjerojatnost lošeg odgovora jajnika na stimulaciju ovulacije i postizanje trudnoće je snižena (47–49). Povišene vrijednosti i FSH i E2 upućuju na veliku mogućnost lošeg odgovora jajnika na stimulaciju ovulacije.

### 1.2.2. Inhibin B

Inhibin B je hormon kojeg luče granuloza stanice manjih antralnih folikula u folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa. Koncentracija inhibina B pokazuje znatnu intra- i intercikličku varijabilnost, (50,51) te se stoga ne smatra pouzdanim markerom ovarijske rezerve. Iako su njegove vrijednosti niže kod žena sa slabim odgovorom na stimulaciju ovulacije (52,53), čak i izrazito niske vrijednosti od 40 do 45 pg/mL, imaju relativno nisku specifičnost 64-90% i senzitivnost 40-80% u predikciji lošeg odgovora na stimulaciju ovulacije. U većini studija inhibin B ima nisku pozitivnu prediktivnu vrijednost za neuspjeh IVF postupka (50,54–56).

### 1.2.3. Anti-Müllerov hormon (AMH)

Anti-Müllerov hormon izlučuju granuloza stanice preantralnih folikula sve do veličine antralnog folikula od šest do devet milimetara (57–60). To je hormon koji sudjeluje u rastu i razvoju folikula na način da djeluje primarno u jajnicima, a s obzirom da se nalazi i u serumu predstavlja dobar marker za određivanje ovarijske rezerve. Broj antralnih folikula korelira sa rezidualnim folikulima jajnika. Kako se smanjuje broj rezidualnih folikula tako i pada koncentracija AMH u serumu (61,62). Iako se koncentracija AMH ne mijenja značajno između i tijekom ciklusa (63–65), novija istraživanja pokazuju da primjena oralnih hormonskih kontraceptiva i GnRH agonista snižava razinu AMH (66). U postupcima IVF-a prema koncentraciji AMH možemo predvidjeti broj dobivenih jajnih stanica stimulacijom ovulacije te tako otkriti žene koje su u velikom riziku od razvoja sindroma hiperstimulacije jajnika ili one koje će slabo odgovoriti na stimulaciju ovulacije. Niske razine AMH u pacijentica koje su u postupcima IVF-a, ispod 0.7 ng/mL, pokazale su visoku senzitivnost (40-97%), specifičnost (78-92%) i negativnu prediktivnu vrijednost (97-100%) za procjenu lošeg odgovora na stimulaciju ovulacije, što se definira kao dobivanje tri ili manje folikula, ili manje od 2-4 oocite. To znači da će pacijentice s niskim razinama AMH vjerojatnije imati lošiji odgovor na

stimulaciju ovulacije. Međutim, iako se AMH koristi za procjenu ovarijske rezerve, nije se pokazao kao senzitivn ili specifičan prediktor trudnoće (52,67,68).

#### 1.2.4. Broj antralnih folikula (AFC) i volumen jajnika

Ultrazvučna procjena ovarijske rezerve temelji se na određivanju broja antralnih folikula te u manjoj mjeri volumena jajnika.

Antralni folikularni broj označuje broj antralnih folikula veličine 2-10 mm u oba jajnika. Slično kao i AMH, prema vrijednosti AFC može se predvidjeti odgovor jajnika na stimulaciju ovulacije. U žene reproduktivne dobi, u svakom trenutku postoji 20-150 rastućih folikula, od kojih se ultrazvučnom dijagnostikom mogu detektirati oni veći od 2 mm (69,70). Scheffer i suradnici histološkom analizom jajnika dokazali su da je broj malih antralnih folikula proporcionalan preostalom broju primordijalnih folikula (71). U postupcima MPO-a, tri do četiri antralna folikula, imaju visoku specifičnost (73-100%) u predikciji lošeg odgovora na stimulaciju ovulacije, ali je senzitivnost značajno niža (9-73%) (50,72-76).

Volumen jajnika također se može koristiti u procjeni ovarijske rezerve, ali zbog niske senzitivnosti u predikciji odgovora na stimulaciju ovulacije, ne koristi se često u kliničkoj praksi. Volumen jajnika se određuje mjerenjem dužine, širine i dubine jajnika te se izračunava prema formuli (dužina x širina x dubina x 0,52). Smanjenje volumena jajnika korelira s brojem preostalih folikula u jajniku.

#### 1.3. Odgovor jajnika na stimulaciju ovulacije

Optimalna strategija ovarijske stimulacije jest ona kojom se nastoji postići trudnoća u što kraćem vremenu uz što manji rizik razvoja ovarijskog hiperstimulacijskog sindroma. Predikcija odgovora na stimulaciju ovulacije pruža bitnu informaciju i kliničarima i pacijentima. Koristeći se markerima ovarijske rezerve, u kliničkoj praksi najčešće AMH, AFC, uz saznanja o prijašnjim ishodima ovarijske stimulacije, odabire se odgovarajući protokol stimulacije.

Prema Smjernicama Europskog društva za humanu reprodukciju i endokrinologiju (ESHRE), AFC ili AMH preporučuju se kao markeri za predikciju prenatlaženog ili slabog odgovora na stimulaciju ovulacije (77).

Najvažniji neovisan prediktor trudnoće jest broj oocita dobivenih nakon ovarijske stimulacije (78). Normalnim odgovorom jajnika smatra se 10-15 dobivenih oocita po ciklusu (64,67,68). Određen broj pacijentica ima smanjen, manje od 4 oocite (65,69) ili prenatlažen odgovor, više od 15 oocita (63).

### 1.3.1. Slab ovarijski odgovor na stimulaciju ovulacije

Pacijentice sa slabim ovarijskim odgovorom na stimulaciju ovulacije čine sve veći broj pacijentica u postupcima medicinski potpomognute oplodnje. Iako se točan udio ove skupine ne zna, naročito zbog manjka jedinstvenog definiranja, procijenjena učestalost iznosi 9-25% (79,80). S obzirom na sve veću želju za reprodukcijom u kasnijim godinama, za očekivati je da je će taj udio s vremenom biti i veći. U pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom, unatoč adekvatnoj stimulaciji ovulacije, broj dobivenih oocita u postupku je mali, prvenstveno zbog smanjenog kapaciteta jajnika.

Iako etiopatogeneza smanjenog odgovora jajnika na stimulaciju ovulacije nije u cijelosti razjašnjena, najvjerojatnija podloga jest smanjenje ovarijske rezerve. Kako je ranije navedeno, jedan od evidentnih razloga čini starenje jajnika s posljedičnim smanjenjem broja jajnih stanica. Starenje jajnika, bez obzira na to je li riječ o prijevremenom ili fiziološkom starenju, smanjuje ovarijsku rezervu, što rezultira kvantitativnim i kvalitativnim promjenama oocita. Ova stanja rezultiraju ne samo slabim odgovorom na stimulaciju jajnika, već i lošom kvalitetom jajnih stanica (81).

Endometriozna, prethodni kirurški zahvati na jajniku, kromosomski ili genetski poremećaji, metaboličke, autoimune i zarazne bolesti čine stanja koja mogu pridonijeti smanjenju ovarijske rezerve (28,31,32,82). U nekim slučajevima, slab ovarijski odgovor na stimulaciju ovulacije može se javiti kod pacijentica s dobrom ovarijskom rezervom uzrokovan suboptimalnom dozom gonadotropina korištenom za stimulaciju ovulacije, primjerice kod pretilih žena (83), ili zbog prisutnosti genetskih polimorfizama koji utječu na endogene gonadotropine ili njihove receptore (84–86). Jedna od mogućih teorija navodi smanjen broj



folikula senzitivnih na FSH, ili folikula koji ne odgovaraju na egzogenu primjenu FSH kao mogući razlog smanjenog odgovora jajnika (87).

Pojam slabog ovarijskog odgovora na stimulaciju ovulacije, što se u engleskoj literaturi naziva „poor responder“ prvi puta se spominje 1983. godine. Garcia i suradnici tada su ovu skupinu pacijentica definirali kao one s lošim odgovorom jajnika, malim brojem oocita i razinom estradiola nižom od 300 pg/mL uz primjenu standardne stimulacije od 150 IU humanog menopauzalnog gonadotropina (88). Kako bi pružili standardiziranu definiciju i klasifikaciju, vodeća svjetska stručna društva pokušala su postići dogovor u definiranju ove skupine pacijentica.

Bolonjski kriteriji za pacijentice sa slabim odgovorom jajnika nazvani su po gradu gdje su prvi put predloženi i uspostavljeni kao konsenzus tijekom godišnjeg sastanka Europskog društva za humanu reprodukciju i embriologiju (ESHRE) 2011. godine u Bolonji, Italija. Prema tim kriterijima, skupina pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom na stimulaciju ovulacije definirana je kao pacijentice koje ispunjavaju barem dva od tri navedena kriterija: dob od 40 ili više godina, prethodni IVF postupak s manje od 3 dobivene oocite, te niska ovarijska rezerva prema testovima (AFC <5-7, AMH <0,7-1,3 ng/mL) (8). Unatoč širokom prihvaćanju ove klasifikacije i njenom čestom korištenju u kliničkoj praksi, znanstvenici ukazuju na određene nedostatke. Studija Polyzosa i suradnika ističe postojanje brojnih razlika u definiciji ove skupine pacijentica, pri čemu je dokumentirano najmanje 41 različita definicija pacijentica s smanjenom ovarijskom rezervom u 47 randomiziranih studija (89). Također, kvaliteta oocita nasuprot kvantiteti nije istaknuta (90).

Tablica 1. Bologna kriteriji [prema podacima iz (8)]

Barem 2 od navedenih
1. $\geq 40$ godina ili prisustvo drugog rizičnog faktora za slab odgovor jajnika
2. Raniji slab odgovor na stimulaciju ovulacije ( $\leq 3$ oocite u standardnom protokolu SO)
3. Smanjena ovarijska rezerva (AFC $< 5-7$ ili AMH $< 0.5-1.1$ ng/mL)
Ili
<ul style="list-style-type: none"> <li>• U 2 standardne stimulacije ovulacije slab ovarijski odgovor, neovisno o starosti i testovima ovarijske rezerve</li> </ul>

SO – stimulacija ovulacije

U svrhu što jasnijeg definiranja, 2016. predloženi su POSEIDON kriteriji (*engl. Patient-Oriented Strategies Encompassing IndividualizeD Oocyte Number*). POSEIDON kriteriji temelje se na tri ključna parametra: dob pacijentice, broj antralnih folikula i razina anti-müllerovog hormona. Na temelju kombinacije tih parametara, pacijentice su podijeljene u četiri podgrupe koje omogućuju precizniju karakterizaciju njihovog ovarijskog odgovora. Grupa 1 obuhvaća pacijentice mlađe od 35 godina s urednim testovima ovarijske rezerve (AFC  $\geq 5$ , AMH  $\geq 1,2$  ng/mL), ali koje pokazuju neočekivano slab ili suboptimalan odgovor jajnika (manje od 4 oocita ili 4-9 oocita dobivenih aspiracijom). Ova grupa je značajna jer se odnosi na pacijentice koje, unatoč mladoj dobi i relativno urednoj rezervi jajnika, ne postižu očekivane rezultate u postupcima MPO. Grupa 2 uključuje pacijentice starije od 35 godina s urednim testovima ovarijske rezerve (AFC  $\geq 5$ , AMH  $\geq 1,2$  ng/mL), ali s neočekivano slabim ili suboptimalnim ovarijskim odgovorom (manje od 4 oocita ili 4-9 oocita dobivenih aspiracijom). Grupa 3 obuhvaća pacijentice mlađe od 35 godina s poremećenim testovima ovarijske rezerve (AFC  $< 5$ , AMH  $< 1,2$  ng/mL). Grupa 4 se odnosi na pacijentice starije od 35 godina s poremećenim testovima ovarijske rezerve, što se manifestira kroz niski broj antralnih folikula (AFC  $< 5$ ) i nisku razinu anti-müllerovog hormona (AMH  $< 1,2$  ng/mL) (91).

Tablica 2. Poseidon kriteriji [prema podacima iz (91)]

GRUPA 1. Pacijentice <35 god., AFC $\geq$ 5, AMH $\geq$ 1.2 ng/mL i slab odgovor na stimulaciju ovulacije	
1a	Manje od 4 oocite uz standardnu stimulaciju ovulacije
1b	4-9 oocita uz standardnu stimulaciju ovulacije
GRUPA 2. Pacijentice >35 god., AFC $\geq$ 5, AMH $\geq$ 1.2 ng/mL i slab odgovor na stimulaciju ovulacije	
2a	Manje od 4 oocite uz standardnu stimulaciju ovulacije
2b	4-9 oocita uz standardnu stimulaciju ovulacije
GRUPA 3. Pacijentice <35 god., AFC<5, AMH <1.2 ng/mL i slab odgovor na stimulaciju ovulacije	
GRUPA 4. Pacijentice >35 god., AFC<5, AMH <1.2 ng/mL i slab odgovor na stimulaciju ovulacije	

Liječenje pacijentica sa smanjenom rezervom jajnika predstavlja izazov za kliničare. U posljednjih nekoliko desetljeća razvijeni su različiti protokoli stimulacije gonadotropinima, peroralnim lijekovima kao što su klomifen citrat i inhibitori aromataze, te adjuvantne terapije s ciljem povećanja broja jajnih stanica. Unatoč tome, još uvijek nije usuglašen optimalan postupak za ovu skupinu pacijentica. Postoji niz različitih pristupa koji se koriste kako bi se poboljšali rezultati (82), međutim, nažalost, uspjeh postupka izvantjelesne oplodnje kod ovih pacijentica je značajno niži (87).

U postupcima stimulacije ovulacije kod pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom, najčešće su korišteni standardni protokoli koji podrazumijevaju primjenu GnRH agonista ili GnRH antagonista. Meta analize koje su provedene 2014. godine (92) i 2017. godine (93) nisu pronašle statistički značajnu razliku u broju živorođenih kod primjene dugog GnRH agonističkog protokola i GnRH antagonističkog protokola. Međutim, pokazalo se da dugotrajna supresija jajnika primjenom GnRH agonista u dugom protokolu može imati negativan utjecaj na broj folikula što može rezultirati smanjenom kvalitetom i manjim brojem jajnih stanica (94). Zbog toga se češće primjenjuju protokoli poput „microdose flare up“, „short-flare“ protokola te protokoli s GnRH antagonistima koji omogućuju kraću supresiju jajnika. Iako neka istraživanja pokazuju tendenciju da se u dugim GnRH agonističkim protokolima dobije više

zrelih oocita u usporedbi s GnRH antagonističkim protokolima (95), rezultati nisu statistički značajni te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se ovi rezultati potvrdili.

Povećanje doze primijenjenih gonadotropina čini se logičnim izborom u pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom. Razna istraživanja analizirala su učinak povećanja doze gonadotropina primijenjenih u različitim protokolima (96–104). U sustavnom pregledu literature koji je uključivao 16 prospektivnih randomiziranih kontroliranih pokusa, 23 prospektivne nerandomizirane studije i 7 retrospektivnih studija, Tarlatzis i suradnici zaključili su da primjena visokih doza gonadotropina, iznad 300 IU korištenih za stimulaciju ovulacije kod pacijentica sa slabim odgovorom jajnika daje neusklađene rezultate i da su rijetke prospektivne randomizirane studije pokazale minimalnu ili nikakvu korist uopće (105). Studija Barkkanoglu i suradnika je pokazala da nema razlike u broju kliničkih trudnoća, broju oocita i broju odustajanja kod primjene doze gonadotropina od 300 IU, 450 IU i 600 IU u kratkom GnRH agonističkom protokolu (37). Istraživanje provedeno od strane Ezre i suradnika iznosi drugačije rezultate. U navedenoj studiji uspoređene su dvije skupine pacijentica, u prvoj skupini primijenjena je doza od 450 IU rekombinantnog FSH, dok su ispitanice u drugoj skupini primile dvije doze od 300 IU gonadotropina dnevno. Pacijentice koje su primile dozu od 300 IU dva puta dnevno pokazale su statistički značajno veću razinu estradiola, veći broj folikula iznad 15 mm i više oocita, uz povećanje broja živorođenih za 5% (106). Međutim, zbog malog uzorka, svega 23 pacijentice, potrebne su daljnje randomizirane studije kako bi se potvrdili ovi rezultati.

Blaga stimulacija predstavlja protokol u kojem se stimulacija ovulacije potiče gonadotropinima i/ili drugim farmakološkim spojevima (poput inhibitora aromataze ili klomifen citrata) s ciljem ograničenja broja oocita. Američko društvo za reproduktivnu medicinu (ASRM) izdalo je preporuku koja se odnosi na uporabu gonadotropina u blagoj stimulaciji jajnika. Prema njihovom prijedlogu, dnevna doza od  $\leq 150$  IU gonadotropina (s ili bez klomifen citrata ili letrozola) trebala bi se smatrati "blagom stimulacijom jajnika" (1). Primjena protokole blage stimulacije ima za cilj smanjenje troškova liječenja i nelagode pacijentica uzrokovane visokim dozama gonadotropina. Predloženo je da bi prirodni ciklus IVF ili blaga stimulacija bili optimalniji za pacijente sa slabim ovarijskim odgovorom u usporedbi s standardnom stimulacijom (107,108), budući da se smatralo da visoke doze egzogenih gonadotropina povećavaju stopu aneuploidija oocita i embrija. Međutim, kasnija istraživanja demantirala su ovu teoriju (109–112). Ipak, pojedine studije su zabilježile značajno niže stope

živorodne djece po ciklusu od 2,6% u pacijentica koje su podvrgnute izvantjelesnoj oplodnji u prirodnom ciklusu (113,114).

Meta-analiza, provedena od strane Datte i suradnika, analizirala je ishode stimulacije ovulacije kod primjene blagog ili standardnog protokola. U meta analizu je uključeno 31 kontrolirana klinička studija, od kojih je njih 15 provedeno u pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom (107,115–127). Cilj meta analize bio je utvrditi razliku u broju živorodenih, broju odustajanja, broju trudnoća te broju prikupljenih oocita (128). Od pet studija koje su izvijestile o broju živorodenih (107,119,120,122,124), nije pronađena statistički značajna razlika između blagog i standardnog protokola stimulacije ovulacije (RR 0.91, CI 0.68-1.22). Kvaliteta dokaza bila je umjerena zbog prisutne kliničke heterogenosti. Sva uključena istraživanja izvijestila su o broju odustajanja, no nije bilo razlike u riziku od prekida ciklusa između dviju grupa (relativni rizik 1.33 (CI 0.96-1.85)). U sedam ispitivanja koja su izvijestila o broju trudnoća nakon 12. tjedna trudnoće, nije pronađena značajna razlika u postotku ostvarenih trudnoća između različitih protokola stimulacije (RR 1.01, CI 0.81-1.25) (116,118,119,121–123). Također, nisu pronađene statistički značajne razlike u stope kumulativne trudnoće nakon 12. tjedna između blagog i standardnog protokola stimulacije ovulacije, kao ni razlike u stopi klinički potvrđenih trudnoća (RR 0.96, CI 0.79-1.16). Kod usporedbe broja prikupljenih oocita, meta-analiza je pokazala značajno niži broj oocita u blagoj stimulaciji IVF-a (SMD -0.43, CI -0.58, -0.28). U samo jednoj studiji ovi rezultati nisu potvrđeni (118).

Unatoč velikom broju objavljenih studija u posljednjih nekoliko godina, dokazi o efikasnosti blagog protokola stimulacije ovulacije nisu visoke kvalitete. To je prvenstveno zbog razlika u metodologiji istraživanja i nedostatka dogovora o točnoj definiciji pojedinih protokola. Buduća istraživanja tek trebaju usporediti ishode blagog IVF-a (doza  $\leq 150$  IU) s ili bez oralnih lijekova na temelju dovoljno velikog uzorka ispitanika u različitim subgrupama pacijentica (128).

Klomifen citrat je selektivni antagonist estrogenskih receptora koji dovodi do blokiranja ovih receptora na razini hipotalamusa što za posljedicu ima aktivaciju mehanizma negativne povratne sprege i promjenu pulsabilnosti GnRH te oslobađanje FSH iz hipofize s posljedičnim rastom folikula (129). Široko je prihvaćen u kliničkoj praksi gdje se koristi sam ili u kombinaciji sa nižim dozama gonadotropina za blagu stimulaciju ovulacije (130). Nekoliko studija provedeno je na pacijenticama sa slabim odgovorom jajnika, istražujući učinak klomifen citrata na stimulaciju ovulacije, no rezultati nisu jednoznačni. Ranija istraživanja su pokazala da protokoli koji kombiniraju klomifen citrat sa FSH i GnRH antagonistima dovode do smanjenog

broja trudnoća, manjeg broja oocita i smanjenja debljine endometrija (131) u usporedbi sa standardnim protokolima sa gonadotropinima i GnRH agonistima. Međutim, podaci iz sustavnih pregleda i meta-analiza daju drugačije rezultate (132–134). Song i suradnici u meta-analizi iz 2016. godine analizirali se 4 randomizirana kontrolirana klinička pokusa koja su uspoređivala broj živorođene djece i broj kliničkih trudnoća u postupcima s blagom stimulacijom i standardnim IVF-om. Rezultati su pokazali da nema značajne razlike u navedenim ishodima kod primjene klomifen citrata (s ili bez gonadotropina i GnRH antagonista) te konvencionalnog protokola s GnRH agonistima. Također, nije bilo značajne razlike u broju dobivenih oocita između dvije promatrane skupine (95% CI, 1,75 - 2,37; P = 0,77). (133). Međutim, kvaliteta dokaza o primjeni klomifen citrata kod pacijentica sa smanjenom rezervom jajnika je niska, uglavnom zbog heterogenosti između skupina (132,135). Prema smjernicama Europskog društva za humanu reprodukciju i embriologiju u pokušaju da se postigne suglasnost u ovoj kontroverzi, priopćeno je da kod pacijentica sa smanjenom rezervom jajnika nema razlika u sigurnosti i učinkovitosti između samog klomifen citrata, klomifen citrata u kombinaciji s gonadotropinima ili samo stimulacije gonadotropinima. Stoga, iako je kvaliteta dokaza niska, čini se da se sam klomifen citrat ili u kombinaciji s gonadotropinima te samo stimulacija gonadotropinima jednako preporučuju u liječenju pacijentica sa slabim odgovorom jajnika (77).

Letrozol se poput klomifen citrata koristi u blagoj indukciji ovulacije. U ranoj folikularnoj fazi, letrozol smanjuje proizvodnju estrogena blokirajući enzim aromataze, što dovodi do smanjenja negativne povratne sprege na hipotalamus i poticanja lučenja gonadotropina (136–138). Njegova uporaba istraživana je i kod pacijentica s očekivano visokim i niskim odgovorom na stimulaciju ovulacije (138,139). Unatoč tome što je provedeno nekoliko studija koje su istraživale učinkovitost letrozola u poboljšanju rezultata stimulacije kod pacijentica s očekivano slabim ovarijskim odgovorom, rezultati i dalje nisu jednoznačni (135). Dodatak letrozola uz gonadotropine rezultirao je jednakim ishodima u usporedbi s visokim dozama gonadotropina (116). Meta-analiza Bechtejewa i suradnika iz 2017. godine ukazuje da se broj kliničkih trudnoća i broj oocita ne razlikuje pri primjeni letrozola u kombinaciji s FSH-om i GnRH antagonistima u odnosu na standardni protokol (134). Ipak, zbog nedostatka dokaza, smjernice ESHRE-a ne preporučuju dodatak letrozola uz gonadotropine u protokolima stimulacije za liječenje pacijentica s lošim odgovorom jajnika (77).

Nedavno, dvostruka stimulacija (*engl. "dual stimulation"*), počevši u lutealnoj fazi istog ciklusa stimulacije, predložena je kao moguća opcija u cilju povećanja broj dobivenih oocita,

te time i broja embrija u jednom stimulacijskom ciklusu u pacijentica sa smanjenim ovarijskim odgovorom (140,141). Međutim za sada ne postoje dovoljno čvrsti dokazi koji bi opravdali primjenu ove metode u svakodnevnoj praksi (142).

Primjena različitih adjuvantnih terapija ispitivana je u pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom. Adjuvantni pripravci predloženi su kako bi se poboljšao ishod postupka ciljajući različite aspekte, od poboljšanja razvoja folikula i zrelosti oocita do poboljšanja kvalitete embrija i receptivnosti endometrija (135). Među adjuvantnim terapijama spominju se dihidroepiandosteron (DHEA), hormon rasta, steroidni hormoni poput estrogena i progesterona, rekombinantni LH, mioinozitol i koenzim Q10. Unatoč studijama koje govore o učinkovitosti različitih pripravaka, uporaba adjuvanata još nije jednoglasno prihvaćena u liječenju pacijentica s slabim odgovorom jajnika zbog njihove nejasne učinkovitosti. Potrebna su velika i dobro dizajnirana randomizirana klinička ispitivanja kako bi se ustvrdili optimalni protokoli primjene (143). Dihidroepiandrosteron je derivat androgena koji se koristi u pacijentica s slabim ovarijskim odgovorom kako bi se povećao broj i kvaliteta oocita (144). Njegov učinak istražuje se već duži niz godina, te iako se točan mehanizam djelovanja ne zna, smatra se da androgeni stimuliraju odgovor jajnika na gonadotropine te tako potiču folikulogenezu (145). Nekoliko studija izvijestilo je o povećanju broja dobivenih oocita i poboljšanju kvalitete embrija kod pacijentica koje su primale DHEA (146–148), dok druge studije nisu zabilježile značajne razlike u ishodima postupka s upotrebom DHEA (149).

Unatoč nedostatku dovoljno snažnih dokaza i randomiziranih studija koje bi opravdale rutinsku primjenu hormona rasta u svakodnevnoj praksi (135,150), postoje naznake da bi primjena niskih doza hormona rasta mogla poboljšati ishode postupka (151,152). Smatra se da hormon rasta potiče senzitivnost granulosa stanica na djelovanje gonadotropina putem faktora rasta sličnog insulinu-1 (IGF-1), što promovira regrutaciju folikula (153). Studija Harta i suradnika sugerira da bi suplementacija hormonom rasta mogla rezultirati povećanim brojem aspiriranih oocita i mogućim skraćanjem trajanja ovarijske stimulacije (153). Međutim, nedavno proveden randomizirani klinički pokus nije pokazalo statistički značajne razlike u broju aspiriranih oocita između skupine koja je koristila hormon rasta i skupine koja je koristila placebo (5 naspram 4 oocite, 95% CI: 0.95-1-66) (154).

Primjena mio-inozitola, korifolitropina alfa i koenzima Q10 kao adjuvantnih pripravaka u svakodnevnom radu još čini predmet rasprave i budućih istraživanja. Dostupni podaci još uvijek nisu jednoznačni. Mio-inozitol je pokazao poboljšanje u kvaliteti oocita kod žena s sindromom policističnih jajnika. Međutim, kod pacijentica s slabim odgovorom jajnika njegov

učinak do sada nije dokazan (155). U 2018. godini proveden je randomizirani kontrolirani pokus kojim se pokazalo da prethodno liječenje koenzimom Q10 može poboljšati odgovor jajnika i kvalitetu embrija kod žena s lošom prognozom tijekom postupka IVF-a (156).

U posljednje vrijeme sve više pažnja posvećuje se metodama rejuvenacije jajnika. Loša kvaliteta oocita karakterizirana je nuklearnim i citoplazmatskim oštećenjima koja nastaju zbog disfunkcije ili niskog broja mitohondrija. Ova su stanja povezana s procesom starenja jajnika. Mutacije mitohondrijske DNA nakupljaju se tijekom vremena, tako da je veća stopa mutacija prisutna u oocita starijih žena (81). Obogaćivanje mitohondrijima koje uključuje primjenu citoplazme bogate mitohondrijima iz matičnih stanica pojedinca u tkivo jajnika jedna je od metoda rejuvenacije. Ova inovativna metoda ima za cilj poboljšati kvalitetu oocita, proces sazrijevanja, fertilizacije i razvoja embrija. Iako se još uvijek radi o eksperimentalnoj metodi, dosadašnji rezultati su obećavajući (157). Korištenje citoplazme bogate mitohondrijima iz matičnih stanica omogućuje unošenje novih, funkcionalnih mitohondrija u jajne stanice, čime se poboljšava njihova vitalnost i sposobnost za oplodnju i razvoj.

Plazma bogata trombocitima, PRP (*engl. Platelet Rich Plasma*) je terapija koja uključuje upotrebu plazme obogaćene trombocitima, koja sadrži citokine i faktore rasta. Akumulacija trombocita u tkivu potiče proliferaciju stanica i regeneraciju tkiva te povećava sekreciju proteina potaknutih citokinima i faktorima rasta (158,159). Ova metoda prvotno je bila ispitivana u liječenju ponovljenih poremećaja implantacije s ciljem povećanja receptivnosti endometrija (160,161). S obzirom na mehanizam djelovanja, pretpostavljalo se da bi PRP mogao imati pozitivan učinak u pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom ili prijevremenom ovarijskom insuficijencijom potičući angiogenezu i rast folikula (162,163). U studiji Aflatoonian i suradnika, intraovarijski PRP je primijenjen na 17 pacijentica s slabim ovarijskim odgovorom i 7 pacijentica s prijevremenom ovarijskom insuficijencijom. Među pacijenticama sa slabim ovarijskim odgovorom, 8 žena (47%) je ostvarilo spontanu trudnoću, uz stopu živo rađenih od 50%. Kod pacijentica s prijevremenom ovarijskom insuficijencijom nije zabilježena trudnoća, ali je došlo do obnove menstruacije kod 22% njih. Razina AMH, FSH, LH i E2 nije se značajno promijenila prije i nakon primjene PRP kod obje skupine pacijentica (164). Međutim, neke studije su prikazale sniženje razine FSH i LH uz povećanje razine AMH i E2 nakon primjene PRP (165,166). Također, iako provedena na malom broju ispitanica, studije su zabilježile i povećanje broja aspiriranih oocita nakon primjene PRP-a (167). Daljnja istraživanja i randomizirani klinički pokusi pokazat će stvarnu učinkovitost ove metode.



U našem istraživanju usredotočili smo se na usporedbu fiksno i fleksibilno GnRH antagonističkog protokola stimulacije ovulacije u pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom. Glavni cilj istraživanja bio je usporediti ishode IVF postupaka, jer, prema našem saznanju, dosad nije provedeno slično istraživanje u ovoj skupini pacijentica. Također, istražili smo kako koncentracija LH, E2 i P4 tijekom folikularne faze stimulacije ovulacije utječe na broj i kvalitetu oocita te ishod postupka.

## **2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

Vrijeme primjene antagonističkog protokola stimulacije ovulacije utječe na ishod IVF-a u žena sa slabim ovarijskim odgovorom.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

#### Opći cilj

Usporediti ishode IVF postupaka u žena sa slabim ovarijskim odgovorom koje koriste fiksni ili fleksibilni GnRH antagonistički protokol stimulacije ovulacije.

#### Specifični ciljevi

1. Usporediti kako koncentracija LH, E2 i P4 u ranoj folikularnoj fazi fiksnog i fleksibilnog GnRH antagonističkog protokola stimulacije ovulacije utječe na broj i kvalitetu oocita i IVF ishod.
2. Analizirati da li koncentracija estradiola, LH i progesterona u folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa može pomoći u odabiru vrste GnRH antagonističkog protokola u žena sa slabim ovarijskim odgovorom.
3. Odrediti koji je optimalni protokol stimulacije ovulacije za žene sa slabim ovarijskim odgovorom.
4. Pokazati da će se odabirom optimalnog protokola stimulacije ovulacije za žene sa slabim ovarijskim odgovorom smanjiti odustajanje, broj korištenih lijekova te povećati broj trudnoća.

## 4. ISPITANICE I METODE

Ovo prospektivno istraživanje provedeno je na Zavodu za humanu reprodukciju, Klinike za ženske bolesti i porodništvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Zavodu za humanu reprodukciju i ginekološku endokrinologiju Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u razdoblju od siječnja 2019. do prosinca 2022. godine. U istraživanje su uključene ukupno 102 pacijentice koje spadaju u skupinu žena sa slabim ovarijskom odgovorom na stimulaciju ovulacije definiranim prema Bolonjskim kriterijima. Za stimulaciju ovulacije u svih se pacijentica koristio antagonistički GnRH protokol. Nasumičnim odabirom pacijentice su podijeljene u skupinu kod kojih se koristio fiksni ili fleksibilni GnRH antagonistički protokol stimulacije ovulacije.

Sve su pacijentice dobrovoljno pristupile istraživanju te potpisale informirani pristanak.

Ovo istraživanje provedeno je uz suglasnost Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičkog povjerenstva Klinike za ženske bolesti i porodništvo KBC-a Zagreb te Etičkog povjerenstva Klinike za ženske bolesti i porodništvo KBC-a Sestre milosrdnice.

### 4.1. Ispitanice

Prema kriterijima Europskog društva za humanu reprodukciju i embriologiju pacijentice sa slabim ovarijskim odgovorom na stimulaciju ovulacije čine one kod kojih su prisutna dva od tri navedena kriterija:

1. Starost:  $\geq 40$  god.
2. Pacijentica koje su u prethodnoj stimulaciji ovulacije standardnim protokolom dobile manje od ili 3 oocite, ili su u prethodna 2 pokušaja s maksimalnom stimulacijom imale slab odgovor.
3. Smanjena ovarijska rezerva, koja je definirana kao antralni folikularni broj manji od 7 ili koncentracija anti-Müllerovog hormona manja od 9.3 pmol/L.

## 4.2. Kriteriji isključenja

Iz istraživanja su isključene sljedeće skupine pacijentica:

- Pacijentice kod kojih se embriotransfer nije izvršio u istom ciklusu.
- Pacijentice sa sindromom policističnih jajnika.
- Pacijentice s indeksom tjelesne mase (*engl. Body Mass Index - BMI*) većim od 28 kg/m<sup>2</sup>.
- Pacijentice s vrijednostima tireoidnog stimulirajućeg hormona (TSH) iznad 2.5 mU/L.
- Pacijentice kod kojih postoji anomalija građe maternice.
- Pacijentice koje su podvrgnute jednostranoj ovariektomiji.

#### 4.3. Parametri i ishodi

Bazalni parametri određivani prije početka stimulacije ovulacije:

- Dob
- Indeks tjelesne mase (BMI)
- Koncentracija prolaktina (PRL), tiroidnog stimulirajućeg hormona (TSH)
- Vrijednosti anti-Müllerovog hormona (AMH) - izražene u mjernoj jedinici pmol/L
- Koncentracija FSH, LH – izražene u mjernoj jedinici IU/L
- Koncentracija progesterona – izražena u mjernoj jedinici nmol/L
- Koncentracija estradiola – izražena u mjernoj jedinici pmol/L
- Ultrazvučno određivanje broja antralnog folikula (broj folikula veličine 2-9 mm na oba jajnika mjerenih u ranoj folikularnoj fazi ciklusa)

Primarni ishodi:

- Klinički potvrđena trudnoća sa 6-8 tj.gestacije
- Broj pobačaja: spontani/zadržani/inkompletni/kompletni pobačaj
- Praćenje trudnoće do 12. tjedna gestacije

Sekundarni ishodi:

- Dužina trajanja stimulacije
- Količina potrošenih lijekova (gonadotropina i GnRH antagonista)
- Ukupan broj dobivenih oocita i broj oocita u metafazi II
- Broj embrija
- Broj odustajanja

#### 4.4. Odabir protokola i praćenje ispitanica za vrijeme stimulacije ovulacije

Ispitanice su nasumičnim odabirom podijeljene u dvije skupine: fiksni GnRH antagonistički protokol i fleksibilni GnRH antagonistički protokol. Stimulacija ovulacije započela je primjenom rekombinantnog FSH-a ili urinarnog visokopročišćenog oblika FSH-a i LH-a (menotropin) drugog dana menstrualnog ciklusa, u dozi od 225-300 IU. Doza je prilagođena ovisno o dobi pacijentice, procijenjenoj rezervi jajnika i odgovoru jajnika u prethodnim ciklusima stimulacije ovulacije. Tijekom stimulacije, doza gonadotropina je prilagođavana prema odgovoru ispitanice, s maksimalnom dozom od 50 IU/L.

U skupini s fiksnim protokolom, GnRH antagonist cetorelix (0,25 mg/dan) primjenjivan je od 6. dana stimulacije do dana primjene humanog korionskog gonadotropina (hCG). U skupini s fleksibilnim protokolom, GnRH antagonist cetorelix (0,25 mg/dan) uveden je kada je veličina folikula dosegla 13-14 mm i nastavljen je do dana primjene hCG-a. U obje skupine pacijentice su redovito praćene ultrazvukom radi praćenja rasta folikula. Kada je veličina folikula dosegla 17-18 mm, primijenjen je rekombinantni hCG (Ovitrelle 250 mcg) za dozrijevanje oocita.

#### 4.5. Prikupljanje uzoraka i obrada krvi

U istraživanju, u skupini pacijentica s fiksnim protokolom, koncentracija estradiola, LH i progesterona određivana je drugog dana menstrualnog ciklusa, šestog dana stimulacije te na dan primjene rekombinantnog hCG-a.

U skupini pacijentica s fleksibilnim protokolom, koncentracija LH, estradiola i progesterona određivana je drugog dana menstrualnog ciklusa, na dan uvođenja GnRH antagonista te na dan primjene rekombinantnog hCG-a.

Za analizu serumskih razina LH, estradiola i progesterona korištena je kemiluminescentna metoda imunološkog ispitivanja mikročestica (*engl. Chemiluminescent Microparticle Immunoassay - CMIA*) metoda. CMIA metoda temelji se na imunokemijskoj detekciji specifičnih tvari u uzorcima tijela. Ova metoda koristi reakciju antigen-antitijelo i kemiluminiscentnu detekciju za mjerenje rezultata. Za analizu je korišten analizator Architect i1000 proizvođača Abbott iz Sjedinjenih Američkih Država.

#### 4.6. Aspiracija folikula

Trideset i šest sati nakon injekcije rekombinantnog hCG-a uslijedila je transvaginalno navođena aspiracija folikula. Oocite su oplodene metodom IVF ili ICSI, ovisno o nalazu spermograma. Nakon aspiracije folikula sve ispitanice započele su sa lutealnom potporom progesteronom (mikronizirani progesteron 3x200 mg na dan) do dana određivanja beta-hCG-a. Ukoliko je nalaz pozitivan, terapija progesteronom bi se nastavila do prvog ultrazvučnog pregleda.

#### 4.7. Embrio transfer

Svježi embriotransfer (ET) izveden je trećeg ili petog dana pod kontrolom ultrazvuka. Maksimalno su prenesena 2 embrija. Koncentracija progesterona mjerena je na dan primjene hCG-a, te ukoliko bi ona iznosila  $\geq 5.1$  nmol/L, svježi embriotransfer je odgođen. Serumski beta-hCG određen je 12-14 dana nakon embriotransfera. U slučaju pozitivnog rezultata, kontrolni beta-hCG određen je nakon 48 sati. Ultrazvučni pregled za potvrdu trudnoće obavljen je 5-6 tjedana nakon embriotransfera.

#### 4.8. Statističke metode

Prije samog početka istraživanja izračunali smo minimalan potreban broj ispitanica za dokazivanje statistički značajne razlike pomoću analize statističke snage, koristeći G-Power 3.1.9.6 program. Pronašli smo da kod ponovljenih mjerenja uz srednju veličinu učinka  $f=0,5$ , 80% snage, 2 skupine, 3 mjerenja, korelaciju  $r=0,5$  između mjerenja te 5% razinu značajnosti ( $\alpha$ ), potreban uzorak iznosi 102 ispitanice. Priprema podataka izvršena je pomoću računalnog tabličnog kalkulatora Microsoft Office Excel. Podaci su prikazani tablično i grafički. U statističkoj analizi skupine su opisane deskriptivno uz inferencijalne statističke metode. Kategorijske varijable prikazane se proporcijama i postocima dok su kontinuirane varijable prikazane medijanom i interkvartilnim rasponom (25. i 75. percentila, Q1/Q3) kod nepravilne distribucije ili pak srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom kod pravilne distribucije.



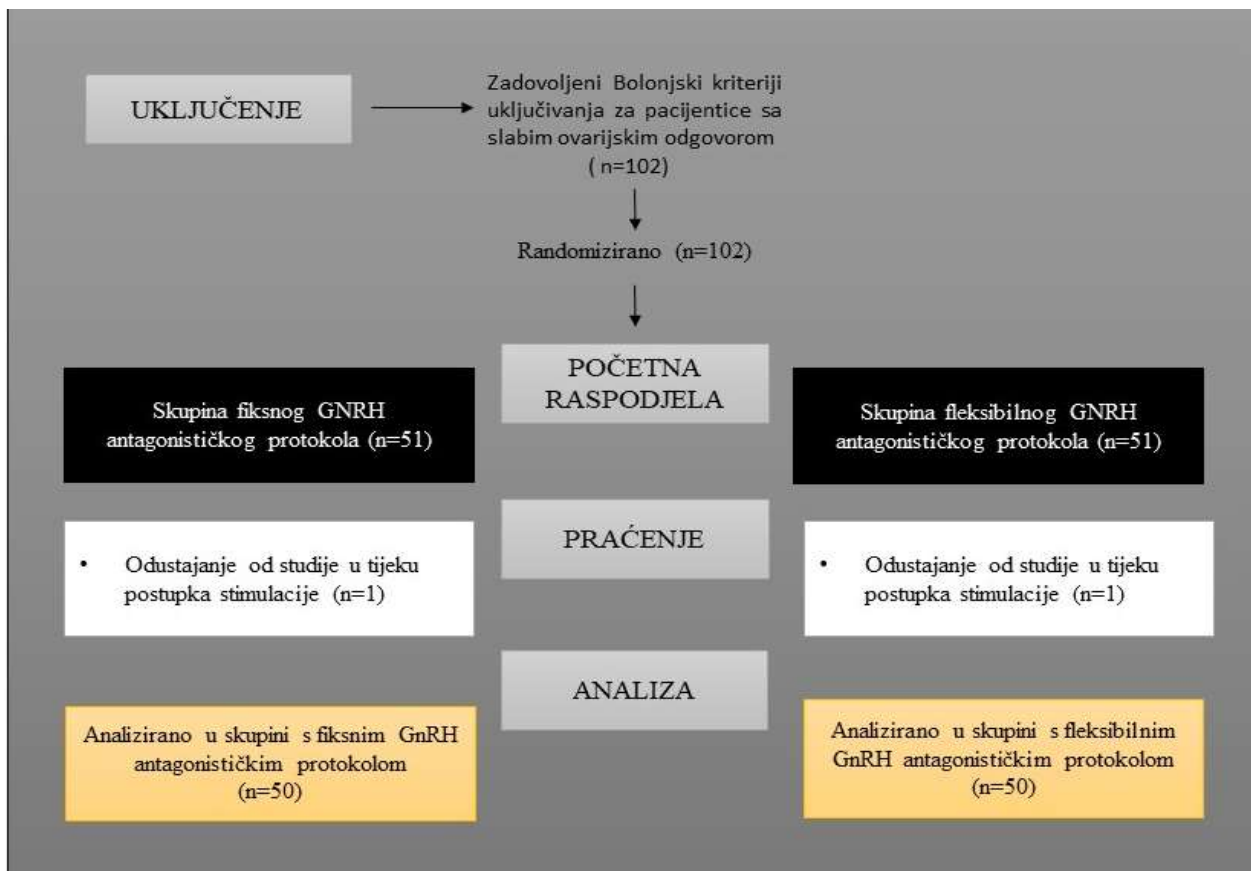
Pravilnost raspodjele numeričkih varijabla testirana je Shapiro Wilkovim testom i grafički. Naknadno su primijenjeni parametrijski ili neparametrijski statistički testovi, ovisno o distribuciji. Razlike u razdiobi kategoričkih varijabli i proporcija između skupina testirane su  $\chi^2$ -testom. Za testiranje razlika između dviju nezavisnih skupina primijenjen je Mann-Whitney U-test. Za analizu mjerenja podskupina prema statusu ostvarene trudnoće korištena je Kruskal Wallis analiza varijance, a za analizu ponovljenih mjerenja kontinuiranih varijabli korištena je Friedmanova analiza varijance. Za ispitivanje razlika između pojedinih skupina korištena je post hoc analiza pomoću Wilcoxon t-testa, uz primjenu Bonferonijeve korekcije za višestruke usporedbe.

U statističkoj analizi korišten je IBM SPSS Statistics 25.0, Armonk, NY, IBM Corp., dok je za izradu grafičkih prikaza korišten statistički program R. Za razinu statističke značajnosti u svim je testovima postavljena na vrijednost  $p < 0.05$ .

## 5. REZULTATI

U istraživanje su uključene 102 ispitanice, od čega su dvije odustale od studije u postupku ovarijske stimulacije. U daljnjem tijeku istraživanja potrebna mjerenja te praćenje provedene su na uzorku od 100 ispitanica, od kojih je u 50 ispitanica primijenjen fiksni GnRH antagonistički protokol te u 50 ispitanica fleksibilni GnRH antagonistički protokol. Tijek istraživanja prikazan je u obliku dijagrama koji je standard za randomizirana istraživanja (Slika 1).

U Tablici 3 prikazani su anamnestički podaci svih pacijentica uključenih u istraživanje. Analiza ulaznih, nezavisnih varijabli nije pokazala statistički značajne razlike između dviju glavnih promatranih skupina. Pacijentice u obje skupine bile su slične dobi (medijan 38 i 39 godina) i trajanja steriliteta (medijan 3 godine). U skupini s fiksnim protokolom, 20 ispitanica je imalo prethodno ostvarenu trudnoću, dok ih je u skupini s fleksibilnim protokolom bilo 17. Broj ranijih poroda i pobačaja nije se statistički razlikovao između dviju skupina.



**Slika 1.** Tijek istraživanja (uključenje – početna raspodjela – praćenje – analiza).

**Tablica 3.** Anamnestički podatci pacijentica uključenih u istraživanje (N = 100).

	Fiksni GnRH antagonistički protokol	Fleksibilni GnRH antagonistički protokol	P
<b>Broj pacijentica, N</b>	50	50	
<b>Dob, godina</b>			
Prosjek (SD)	38.0 (2.9)	38.2 (3.7)	0.54*
Medijan (IQR, Q1-Q3)	38 (4.25, 36-40.25)	39 (6, 35-41)	
<b>Trajanje neplodnosti, godina</b>			
Prosjek (SD)	3.5 (2.6)	3.7 (3.3)	0.749*
Medijan (IQR, Q1-Q3)	3 (2, 2-4)	3 (2, 2-4)	
<b>Sterilitet, n (%)</b>			0.534**
Primarni	30 (60)	33 (66)	
Sekundarni	20 (40)	17 (34)	
<b>Broj rodilja, n (%)</b>	12 (24)	10 (20)	
<b>Broj ranijih poroda (paritet), n</b>			
Prosjek (SD)	0.24 (0.43)	0.22 (0.46)	0.673*
Medijan (IQR, Q1-Q3)	0 (0.25, 0-0.25)	0 (0, 0-0)	
<b>Broj pacijentica s pobačajima, n (%)</b>	11 (22)	8 (16)	
<b>Broj ranijih pobačaja, n</b>			
Prosjek (SD)	0.3 (0.6)	0.2 (0.4)	0.407*
Medijan (IQR, Q1-Q3)	0 (0, 0-0)	0 (0, 0-0)	

\*Mann-Whitney U-test

\*\*  $\chi^2$ -testP – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$ 

SD – standardna devijacija

N – broj ispitanica

U Tablici 4 prikazan je muški faktor steriliteta koji je zabilježen u istraživanju. Utvrđeno je da je muški faktor steriliteta bio prisutan kod 40% pacijentica u skupini s fiksnim protokolom i kod 30% pacijentica u skupini s fleksibilnim protokolom, pri čemu nije bilo statistički značajne razlike.

**Tablica 4.** Muški faktor neplodnosti (N=100).

	Fiksni GnRH antagonistički protokol	Fleksibilni GnRH antagonistički protokol	P*
<b>Spermiogram, n (%)</b>			0.628
Normozoospermija	30 (60)	35 (70)	
Azoospermija	0	1 (2)	
Astenozoospermija	4 (8)	3 (6)	
Astenozoonecrospermija	1 (2)	0	
Oligozoospermija	2 (4)	0	
Oligoastenozoospermija	6 (12)	6 (12)	
Oligoastenoteratospermija	1 (2)	1 (2)	
Teratozoospermija	2 (4)	1 (2)	
TESE	4 (8)	3 (6)	

\*  $\chi^2$ -test

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

SD – standardna devijacija

N – broj ispitanika

TESE – biopsija testisa

U Tablici 5 prikazani su rezultati broja antralnih folikula, razine anti-Müllerovog hormona, razine prolaktina i tireostimulirajućeg hormona prije postupka. Analiza je pokazala da nema statistički značajnih razlika u tim parametrima između dviju glavnih skupina. Prosječan broj antralnih folikula iznosio je 4.2 u skupini s fiksnim GnRH antagonističkim protokolom i 3.8 u skupini s fleksibilnim GnRH antagonističkim protokolom. Također, razina AMH nije pokazala značajne razlike između skupina, s prosječnom vrijednosti od 4.4 pmol/L u fiksnom protokolu naspram 4.5 pmol/L u fleksibilnom protokolu.

**Tablica 5.** Ultrazvučni i laboratorijski parametri ispitanica na dan uključenja u istraživanje (N = 100).

	Fiksni GnRH antagonistički protokol	Fleksibilni GnRH antagonistički protokol	P*
<b>AFC, n</b>			
Prosjek (SD)	4.2 (1.8)	3.8 (1.5)	0.366
Medijan (IQR, Q1-Q3)	4 (3, 3-6)	4 (2, --5)	
<b>AMH, pmol/L</b>			
Prosjek (SD)	4.4 (2.3)	4.5 (2.3)	0.823
Medijan (IQR, Q1-Q3)	4.5 (4.3, 2.1-6.4)	3.6 (3.4, 2.95-6.35)	
<b>PRL, mIU/L</b>			
Prosjek (SD)	312.95 (150.5)	250 (95.6)	0.095
Medijan (IQR, Q1-Q3)	266 (225.75, 197.75-423.5)	249 (125, 182.25-307.25)	
<b>TSH, mU/L</b>			
Prosjek (SD)	1.71 (0.65)	1.76 (0.83)	0.798
Medijan (IQR, Q1-Q3)	1.65 (0.92, 1.29-2.21)	1.49 (1.16, 1.13-2.3)	

\*Mann-Whitney U-test

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

SD – standardna devijacija

N – broj ispitanica

### 5.1. Postupak stimulacije ovulacije

U analizi parametara stimulacije ovulacije, u Tablici 6 prikazani su rezultati za obje skupine. U skupini ispitanica s fiksnim protokolom GnRH antagonist započet je sedmi dan ciklusa, dok je u skupini s fleksibilnim protokolom primjena GnRH antagonista započela prema ultrazvučnom nalazu, kada je veličina folikula iznosila prosječno 14 mm, što je bilo medijan 9. dan stimuliranog ciklusa. Statistička analiza pokazala je značajno duže trajanje primjene GnRH antagonista u fiksnom protokolu (medijan 5 dana) u usporedbi s fleksibilnim protokolom (medijan 4 dana) ( $P = 0,02$ ).

U praćenju djelovanja primijenjenih gonadotropina, analizirani su tip korištenih gonadotropina, početna i ukupna doza, trajanje primjene i potreba za prilagodbom doze. Osamnaest pacijentica u svakoj ispitivanoj skupini primilo je rekombinantni oblik FSH-a. Urinarni, visokopročišćeni oblik FSH-a i LH-a (menotropin) primijenjen je u 19 pacijentica u fiksnom protokolu te u 8 pacijentica u fleksibilnom protokolu. U fiksnom protokolu, kombinacija rekombinantnog FSH-a i rekombinantnog LH-a primijenjena je u 9 ispitanica, dok je u fleksibilnom protokolu primijenjena u 7 ispitanica. Kombinacija menotropina sa rekombinantnim oblicima FSH-a primijenjena je u 3 ispitanice u fiksnom protokolu, dok je u fleksibilnom protokolu primijenjena u 11 ispitanica. Pacijentice u obje skupine započele su postupak ovarijske stimulacije s istom medijan početnom dozom gonadotropina od 300 I.J., pri čemu nisu pronađene statistički značajne razlike između skupina. Međutim, u skupini ispitanica s fleksibilnim protokolom gonadotropini su značajno duže primjenjivani (medijan 10,5 dana) uz ukupnu veću dozu (medijan 2812,5 I.J.) u usporedbi s pacijenticama u fiksnom protokolu (medijan 9,5 dana i 2475 I.J.) ( $P = 0,001$  i  $P = 0,009$ ). Nije bilo statistički značajnih razlika između dviju skupina u potrebi za prilagodbom doze tijekom stimulacije.

Pacijentice u skupini s fleksibilnim protokolom primile su značajno kasnije rekombinantni hCG ("štoperica") u odnosu na pacijentice u skupini s fiksnim protokolom (fiksni; medijan 11. dan, fleksibilni; medijan 12,5 dana,  $P < 0,001$ ).

**Tablica 6.** Parametri stimulacije ovulacije (N=100).

	Fiksni GnRH antagonistički protokol	Fleksibilni GnRH antagonistički protokol	P
<b>Tip gonadotropina, n</b>			
Gonal F	9	7	
Bemfolia	2	2	
Ovaleap	5	8	
Pergoveris	9	7	
Puregon	1	0	
Rekovelte	1	1	
Menopur	19	8	
Elonva	0	0	
Kombinacije	4	14	
Gonal F + Menopur	3	8	
Gonal F + Pergoveris	1	6	
Pergoveris + Menopur	0	1	
Rekovelte + Menopur	0	1	
Puregon + Elonva	0	1	
<b>Počtna doza gonadotropina, IU</b>			
Prosjeak (SD)	280.5 (39.5)	278.5 (40.3)	0.77*
Medijan (IQR, Q1-Q3)	300 (0, 300-300)	300 (75, 225-300)	
<b>Trajanje primjene gonadotropina, dan</b>			
Prosjeak (SD)	9.24 (1.77)	10.76 (2.1)	0.001 *
Medijan (IQR, Q1-Q3)	9.5 (3, 8-11)	10.5 (3.25, 9-12.25)	
<b>Adaptacija doze gonadotropina, n (%)</b>	2 (4)	2 (4)	0.513**
Povećanje doze	0	1 (2)	
Smanjenje doze	2 (4)	1 (2)	
<b>Ukupna doza gonadotropina, IU</b>			
Prosjeak (SD)	2557.5 (586.894)	3004 (787.747)	0.009 *
Medijan (IQR, Q1-Q3)	2475 (900, 2100-3000)	2812.5 (1275, 2400-3675)	
<b>Dan primjene GnRH antagonista</b>			
Prosjeak (SD)	6.9 (0.1)	8.9 (1.7)	< 0.001 *
Medijan (IQR, Q1-Q3)	7 (0, 7-7)	9 (2, 8-10)	
<b>Trajanje primjene GnRH antagonista, dan</b>			
Prosjeak (SD)	4.7 (1.7)	3.9 (1.7)	0.02*
Medijan (IQR, Q1-Q3)	5 (3, 3-6)	4 (2, 3-5)	
<b>Rekombinantni hCG , dan ciklusa</b>			
Prosjeak (SD)	11.1 (1.8)	12.9 (2.2)	< 0.001*
Medijan (IQR, Q1-Q3)	11 (2, 10-12)	12.5 (4, 11-15)	

\*Mann-Whitney U-test

\*\*  $\chi^2$ -test

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

SD – standardna devijacija

N – broj ispitanica

Analizirajući broj razvijenih folikula, veličinu folikula i debljinu endometrija, primijećene su gotovo jednake vrijednosti parametara između dviju skupina, prikazane u Tablici 7. Nisu zabilježene statistički značajne razlike u navedenim parametrima. U obje skupine, prosječno je dobiveno 4 folikula tijekom postupka, prosječna debljina endometrija iznosila je 9,7 mm u fiksnom, odnosno 9,9 mm u fleksibilnom protokolu (P= 0,986).

**Tablica 7** Ultrazvučni pokazatelji tijekom stimulacije ovulacije.

	Fiksni GnRH antagonistički protokol	Fleksibilni GnRH antagonistički protokol	P*
<b>Broj folikula, n</b>			
Prosjek (SD)	4.3 (2.2)	4.4 (1.9)	0.737
Medijan (IQR, Q1-Q3)	4 (3, 3-6)	4 (2.25, 3-5.25)	
Desni jajnik			
Prosjek (SD)	2.2 (1.2)	2.2 (1.2)	0.915
Medijan (IQR, Q1-Q3)	2 (2, 1-3)	2 (2, 1-3)	
Lijevi jajnik			
Prosjek (SD)	2.1 (1.6)	2.2 (1.5)	0.583
Medijan (IQR, Q1-Q3)	2 (2, 1-3)	2 (2, 1-3)	
<b>Folikulometrija, mm</b>			
Prosjek (SD)	15.9 (2.9)	16.9 (2.8)	0.117
Medijan (IQR, Q1-Q3)	16.4 (2.3, 15-17.3)	16.9 (2.3, 15.6-17.9)	
Desni jajnik			
Prosjek (SD)	16.5 (2.1)	17.0 (1.8)	0.269
Medijan (IQR, Q1-Q3)	17 (2.55, 15.45-18)	17.15 (2.13, 16-18.13)	
Lijevi jajnik			
Prosjek (SD)	16.2 (2.5)	16.2 (2.6)	0.838
Medijan (IQR, Q1-Q3)	16.5 (2.5, 15.5-18)	16.5 (2.8, 15-17.8)	
<b>Debljina endometrija, mm</b>			
Prosjek (SD)	9.7 (1.8)	9.9 (2.2)	0.986
Medijan (IQR, Q1-Q3)	10 (3.05, 8.2-11.25)	10 (2.45, 8.55-11)	

\*Mann-Whitney U-test

P – razina statističke značajnosti, P < 0,05

SD – standardna devijacija



## 5.2. Praćenje razine hormona u postupku stimulacije ovulacije

Razine folikulostimulirajućeg hormona mjerene su prije početka stimulacije ovulacije i drugog dana stimuliranog ciklusa. Tablica 8 prikazuje vrijednosti hormona u oba ispitivana protokola, pri čemu nije bilo statistički značajne razlike između dviju promatranih skupina u oba mjerenja. Medijan vrijednosti FSH-a drugog dana stimuliranog ciklusa iznosio je 8.6 IU/L u fiksnom protokolu i 8.9 IU/L u fleksibilnom protokolu. U niti jedne ispitanica nije zabilježena razina FSH iznad 10.5 IU/L na dan početka primjene gonadotropina.

**Tablica 8.** Vrijednosti FSH mjerene prije stimulacije ovulacije te 2. dan stimuliranog ciklusa.

FSH, IU/L (dan mjerenja)	Prije stimulacijskog protokola			2. dan stimuliranog ciklusa		
	Fiksni GnRH antagonistički protokol	Fleksibilni GnRH antagonistički protokol	P*	Fiksni GnRH antagonistički protokol	Fleksibilni GnRH antagonistički protokol	P*
Prosjek (SD)	9.1 (4.7)	9.3 (4.3)	0.697	7.9 (3.2)	8.9 (3.3)	0.327
Medijan (IQR, Q1-Q3)	8.3 (3.2, 7.1-10.2)	8.6 (4.2, 6.8-11)		8.2 (3.7, 6.3-9.9)	8.9 (3.7, 6.8-10.5)	

\*Mann-Whitney U-test

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

SD – standardna devijacija

U istraživanju su praćene razine luteinizirajućeg hormona, estradiola i progesterona u različitim fazama stimulacije ovulacije te na dan primjene rekombinantnog humanog korionskog gonadotropina. U fiksnom protokolu, ovi hormoni su određivani drugog dana menstrualnog ciklusa, šestog dana stimulacije i na dan primjene rekombinantnog hCG-a. U fleksibilnom protokolu, hormoni su određivani drugog dana menstrualnog ciklusa, na dan uvođenja GnRH antagonista i na dan primjene rekombinantnog hCG-a. Tablica 9 prikazuje vrijednosti ovih hormona u različitim vremenskim intervalima mjerenja. Za statističku analizu korišteni su Mann-Whitney U test i Friedmanova neparametrijska analiza varijance ponavljajućih mjerenja.

Drugog dana stimuliranog ciklusa zabilježene su više razine LH u skupini s fiksnim protokolom (prosječno 4.9 IU/L) u usporedbi s fleksibilnim protokolom (prosječno 3.9 IU/L), ali bez statistički značajnih razlika. Razine LH mjerene tijekom stimuliranog ciklusa te na dan primjene rekombinantnog hCG-a također su bile slične između skupina (prosječno 5.9 IU/L u fiksnom protokolu, 4.9 IU/L u fleksibilnom protokolu mjerenih na dan primjene rekombinantnog hCG-a), bez statistički značajnih razlika.

Primijećene su više vrijednosti estradiola drugi dan stimuliranog ciklusa u skupini s fiksnim protokolom, te više vrijednosti estradiola mjerenih na dan uvođenja antagonista i na dan primjene hCG-a u fleksibilnom protokolu, ali bez statistički značajnih razlika između skupina. Prosječna razina estradiola na dan primjene rekombinantnog hCG-a u skupini ispitanica s fiksnim protokolom iznosila je 3556 pmol/L, dok je u fleksibilnom protokolu iznosila 3697 pmol/L ( $P = 0.823$ ).

Razina progesterona drugog dana ciklusa prosječno je iznosila 1.2 nmol/L u fiksnom protokolu i 1.5 nmol/L u fleksibilnom protokolu, bez statistički značajnih razlika. Međutim, promatrajući mjerenja na dan uvođenja antagonista ( $P = 0.031$ ) i na dan primjene rekombinantnog hCG-a ( $P = 0.007$ ), utvrđena je značajno viša razina progesterona u skupini s fleksibilnim protokolom.

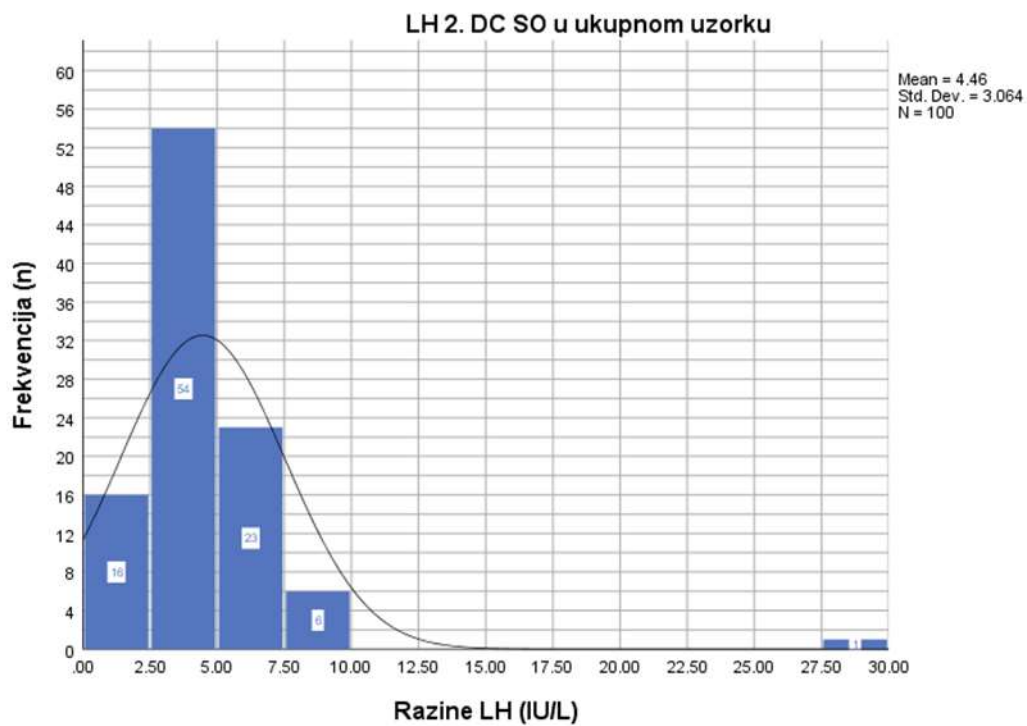
**Tablica 9.** Razine hormona praćene tijekom postupka stimulacije ovulacije.

	2. dan stimuliranog ciklusa			Dan uvođenja GnRH antagonista			Dan primjene rec.-hCG-a		
	Fiksni GnRH ant. protokol	Fleksibilni GnRH ant. protokol	P*	Fiksni GnRH ant. protokol	Fleksibilni GnRH ant. protokol	P*	Fiksni GnRH ant. protokol	Fleksibilni GnRH ant. protokol	P*
<b>LH, IU/L</b>									
Prosjek (SD)	4.9 (4.0)	3.9 (1.6)	0.154	4.62 (5.13)	4.74 (3.97)	0.644	5.9 (5.1)	4.9 (3.9)	0.134
Medijan (IQR, Q1Q3)	4.3 (2.7, 3.0-5.8)	3.6 (1.9, 2.9-4.8)		3.4 (2.7, 2.62-5-32)	4.1 (2.8, 2.3-5.1)		4.55 (2.8, 3.5-6.3)	4.35 (3.2, 2.3-5.5)	
<b>E2, pmol/L</b>									
Prosjek (SD)	225.4 (162.5)	195.1 (110.5)	0.508	1707.9 (1054.8)	1977.2 (1911.6)	0.857	3556.6 (2322.3)	3697.2 (3026.9)	0.823
Medijan (IQR, Q1Q3)	180 (117.5, 137.5-255)	178 (122.75, 126.5249.25)		1689 (1252.75, 915.52168.25)	1451 (1708.3, 873.252581.5)		3310 (3390.5, 1676-5066.5)	3124.5 (3211.5, 1590.254801.75)	
<b>P4 nmol/L</b>									
Prosjek (SD)	1.2 (0.6)	1.5 (2.3)	0.399	1.2 (0.8)	1.5 (0.9)	0.031	1.8 (1.3)	3.0 (3.5)	0.007
Medijan (IQR, Q1Q3)	1 (0.6, 0.7-1.3)	1.1 (0.7, 0.87-1.6)		1 (0.65, 0.731.38)	1.25 (0.9, 0.9-1.85)		1.5 (0.95, 1.1-2.05)	1.9 (1.27, 1.42-2.7)	

\*Mann-Whitney U-test

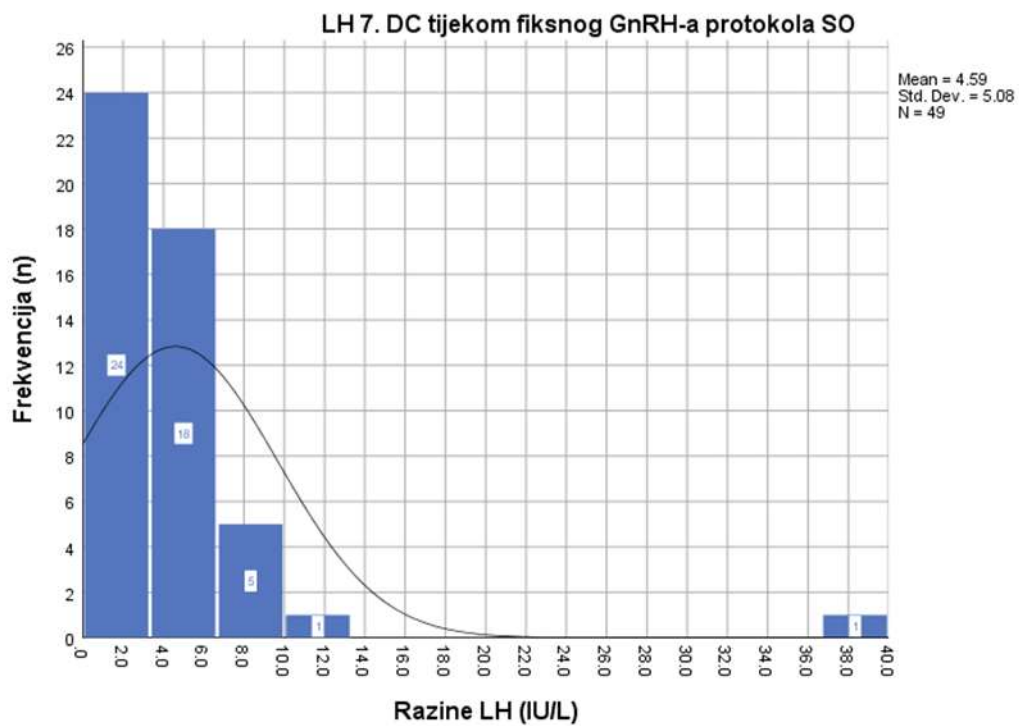
P – razina statističke značajnosti

P < 0,05 SD – standardna devijacija



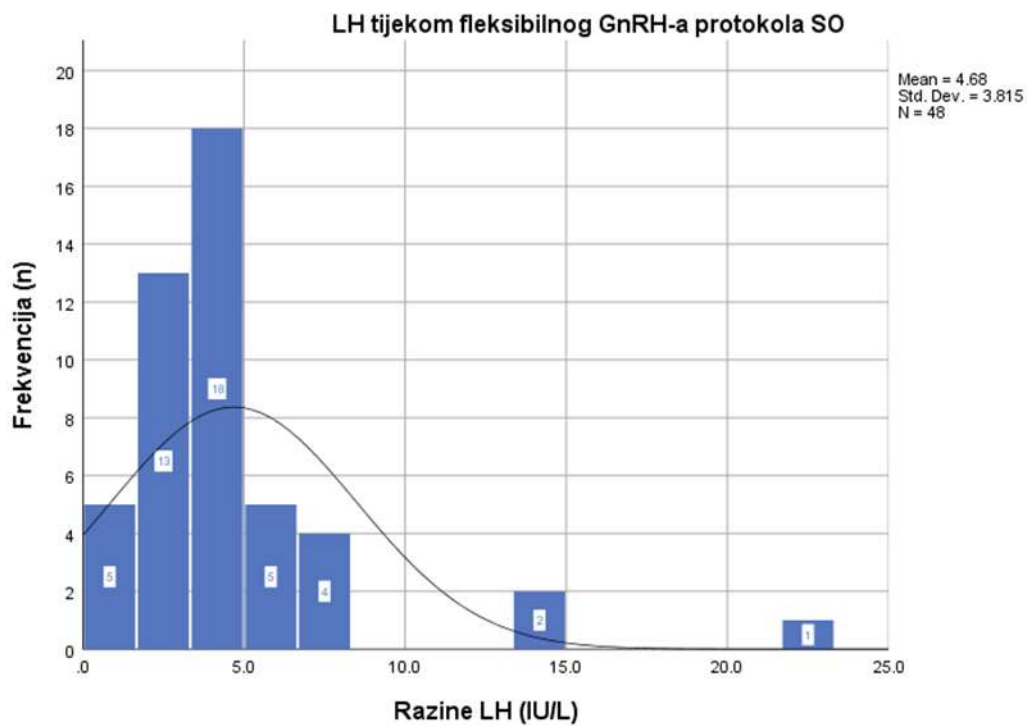
DC- dan ciklusa  
SO- stimulacija ovulacije

**Slika 2.** Vrijednosti LH 2. dana stimulacije ovulacije u ukupnom uzorku.



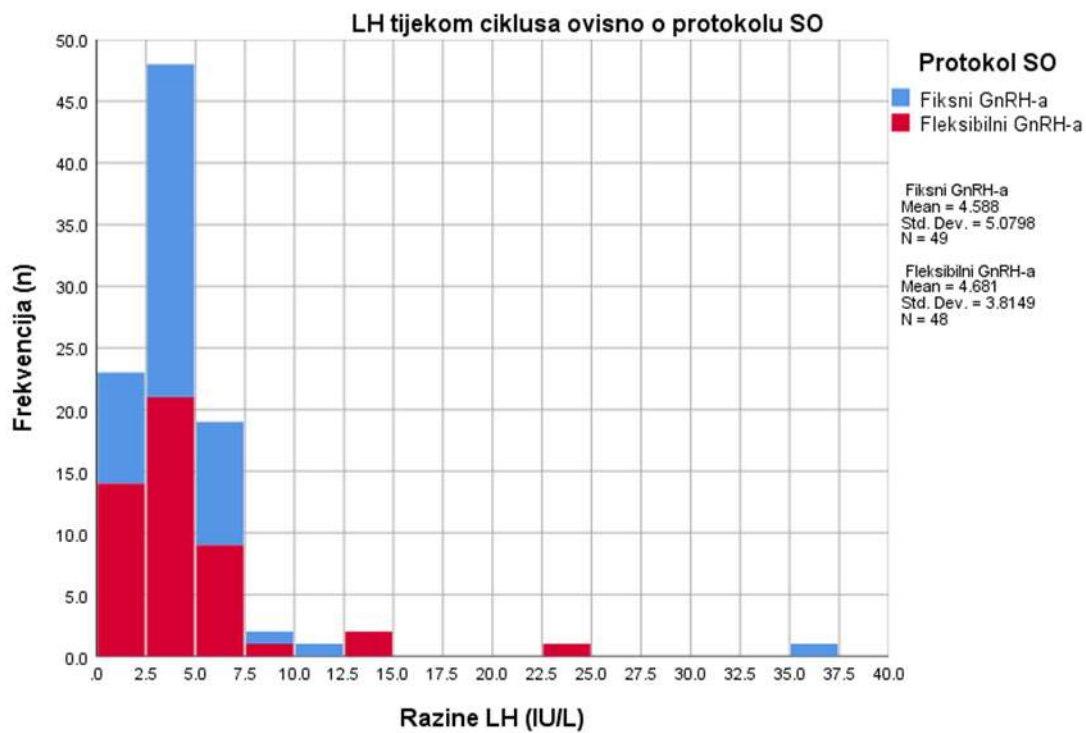
DC- dan ciklusa  
SO- stimulacija ovulacije

**Slika 3.** Vrijednosti LH 7. dana stimulacije ovulacije u skupini pacijentica s fiksnim GnRH antagonističkim protokolom.



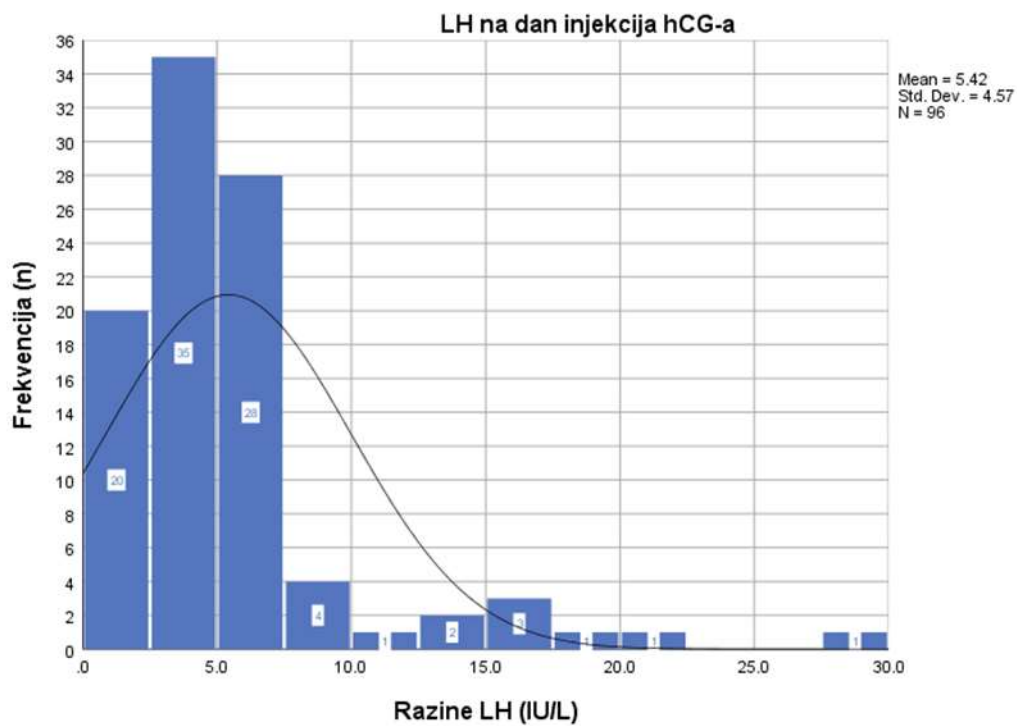
SO- stimulacija ovulacije

**Slika 4.** Vrijednosti LH na dan uvođenja GnRH antagonista u skupini pacijentica s fleksibilnim GnRH antagonističkim protokolom.



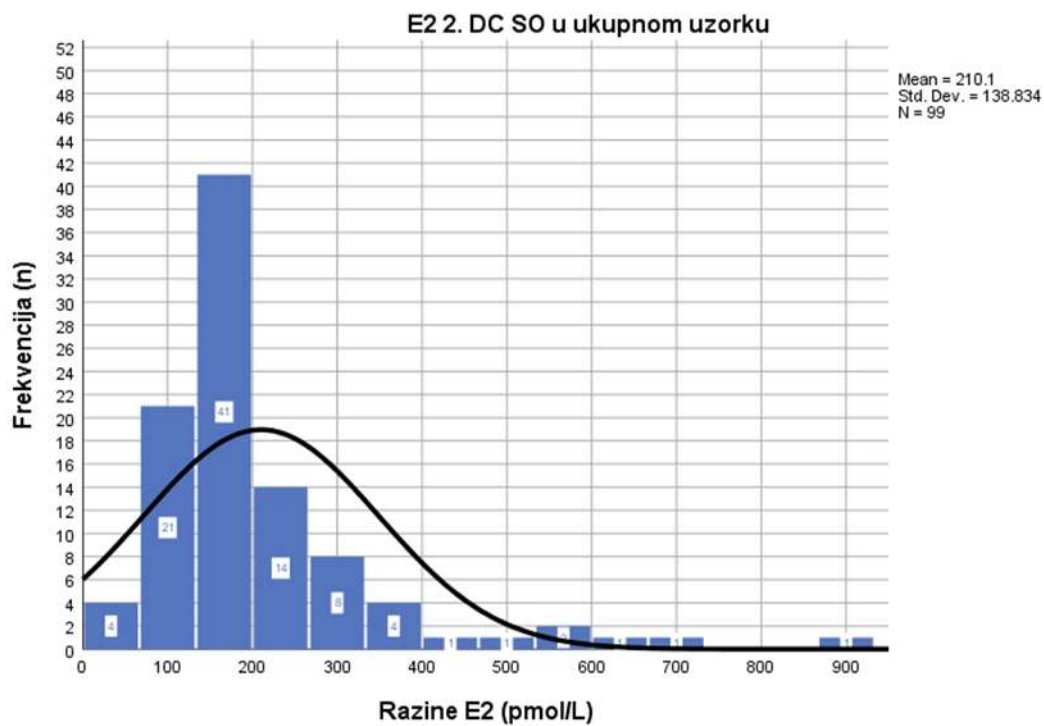
SO- stimulacija ovulacije

**Slika 5.** Vrijednosti LH na dan uvođenja GnRH antagonista u fiksnom i fleksibilnom GnRH antagonističkom protokolu.



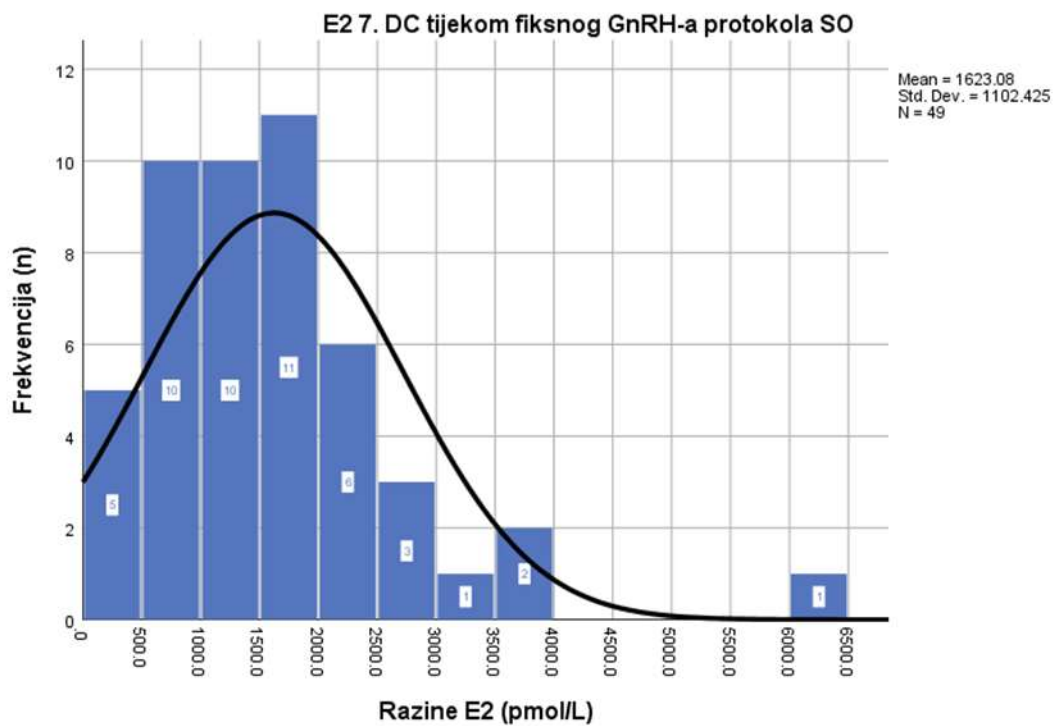
**Slika 6.** Vrijednosti LH na dan primjene rekombinantnog hCG-a u ukupnom uzorku.





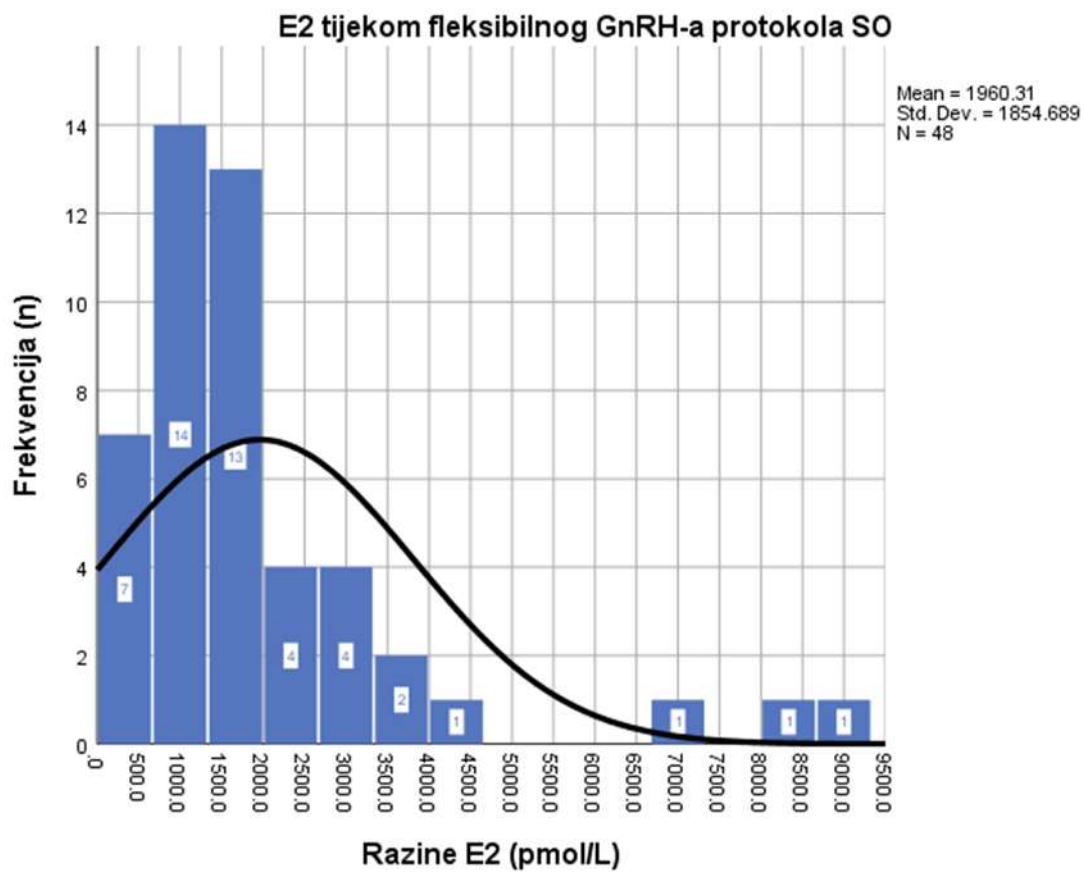
DC- dan ciklusa  
SO- stimulacija ovulacije

**Slika 7.** Vrijednosti estradiola 2. dan stimulacije ovulacije u ukupnom uzorku.



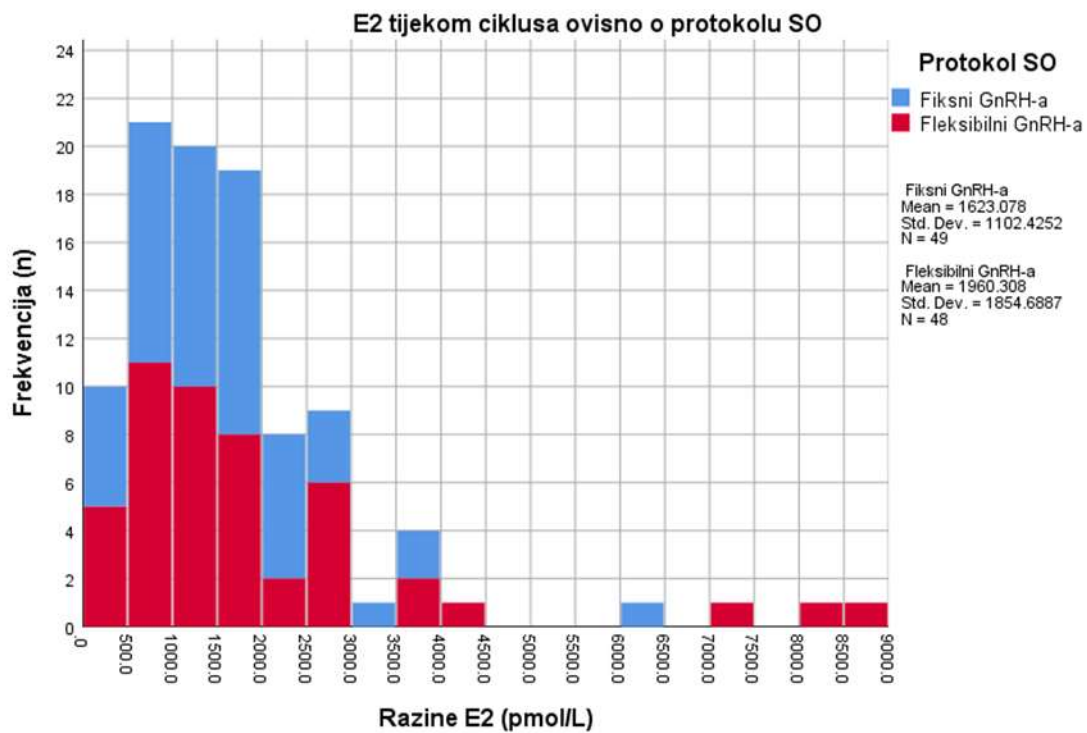
DC- dan ciklusa  
SO- stimulacija ovulacije

**Slika 8.** Vrijednosti estradiola 7. dan stimulacije ovulacije u fiksnom GnRH antagonistčkom protokolu.



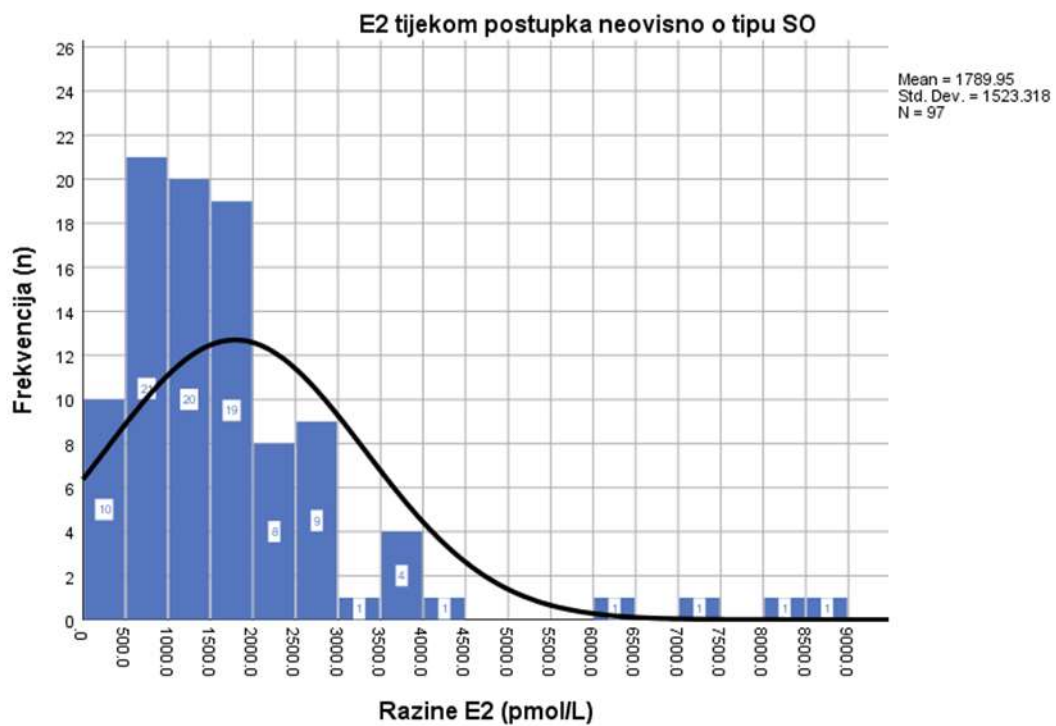
SO- stimulacija ovulacije

**Slika 9.** Vrijednosti estradiola na dan uvođenja antagonista u fleksibilnom GnRH antagonistčkom protokolu.



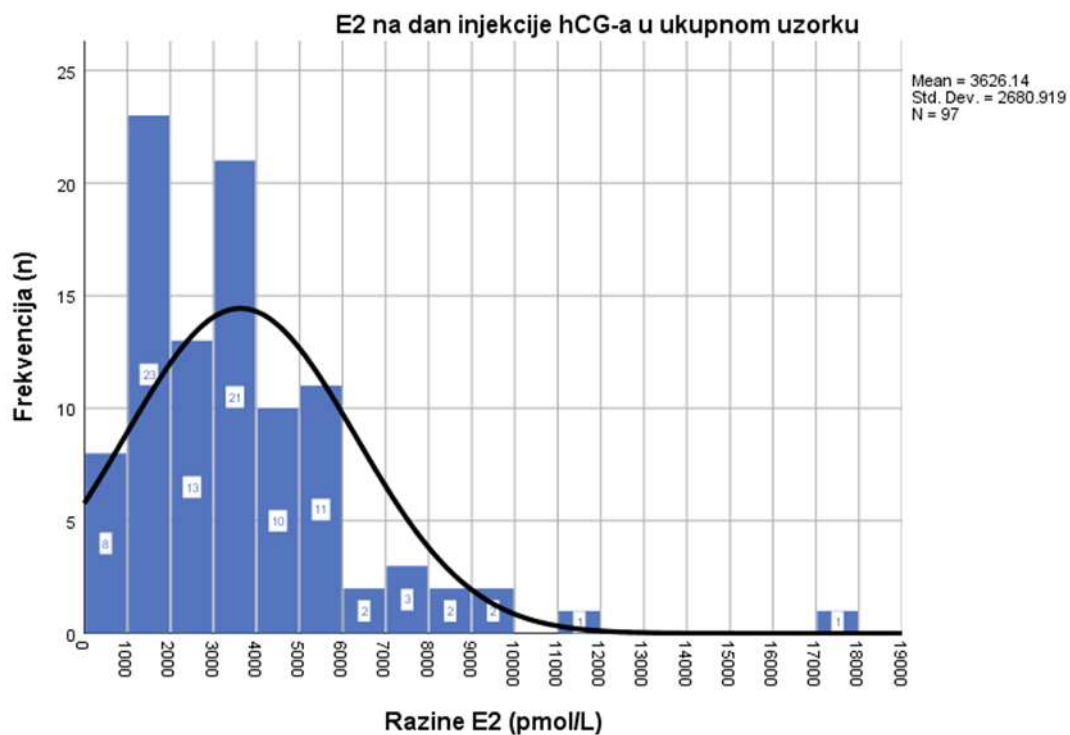
SO- stimulacija ovulacije

**Slika 10.** Vrijednosti estradiola na dan uvođenja GnRH antagonista u fiksnom i fleksibilnom GnRH antagonističkom protokolu.



SO- stimulacija ovulacije

**Slika 11.** Vrijednosti estradiola na dan uvođenja GnRH antagonista u ukupnom uzorku.



**Slika 12.** Vrijednosti estradiola na dan primjene rekombinantnog hCG-a u ukupnom uzorku.

Za analizu vrijednosti hormona LH, E2 i P4 u tri različite točke tijekom stimulacije ovulacije, primijenili smo Friedmanovu analizu varijance za ponovljena mjerenja kako bismo istražili postoji li razlika između različitih točaka mjerenja (tablica 10). Prikazane su statistički značajne razlike između različitih mjerenja hormona u obje skupine pacijentica. Post hoc Wilcoxonova testiranja su otkrila između kojih mjerenja postoji navedena statistički značajna razlika. Kada je riječ o LH, primijećena je stvarna razlika u skupini s fiksnim protokolom između mjerenja na dan uvođenja GnRH antagonista i na dan primjene rekombinantnog hCG-a, kao i između drugog dana ciklusa i dana primjene rekombinantnog hCG-a. Što se tiče E2, stvarne razlike postoje između svih mjerenja u obje skupine pacijentica. U pogledu P4, stvarne razlike su vidljive u obje skupine pacijentica između mjerenja na dan uvođenja GnRH antagonista i na dan primjene rekombinantnog hCG-a, kao i između drugog dana ciklusa i dana primjene rekombinantnog hCG-a (tablica 11).

**Tablica 10.** Razlike u razinama hormona mjerenih u različitim fazama stimuliranog ciklusa u fiksnom i fleksibilnom GnRH antagonističkom protokolu.

	Fiksni GnRH antagonistički protokol	P*	Fleksibilni GnRH antagonistički protokol	P*
<b>LH, IU/L</b>				
2.dan ciklusa	4.3 (3.0-5.8)	0.002	3.6 (2.9-4.8)	0.049
Dan uvođenja antagonista	3.4 (2.62-5-32)		4.1 (2.3-5.1)	
Dan primjene rec-hCG-a	4.55 (3.5-6.3)		4.35 (2.3-5.5)	
<b>E2, pmol/L</b>				
2.dan ciklusa	180 (137.5-255)	<0.001	178 (126.5-249.25)	<0.001
Dan uvođenja antagonista	1689 (915.5-2168.25)		1451 (873.25-2581.5)	
Dan primjene rec-hCG-a	3310 (1676-5066.5)		3124.5 (1590.25-4801.75)	
<b>P4, nmol/L</b>		<0.001		<0.001
2.dan ciklusa	1 (0.7-1.3)		1.1 (0.87-1.6)	
Dan uvođenja antagonista	1 (0.73-1.38)		1.25 (0.9-1.85)	
Dan primjene rec-hCG-a	1.5 (1.1-2.05)		1.9 (1.42-2.7)	

\*Fridmanov test

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

SD – standardna devijacija

Rec.-hCG - rekombinantni hCG

N – broj ispitanica



**Tablica 11.** Post hoc Wilcoxon test ponovljenih mjerenja vrijednosti hormona.

Interval mjerenja	Fiksni GnRH antagonistički protokol	P*	Fleksibilni GnRH antagonistički protokol	P*
	Test statistic	P	Test statistic	P
<b>LH</b>				
2. dan ciklusa – dan uvođenja GnRH antagonista	0.919	0.358	-0.361	0.718
Dan uvođenja GnRH antagonista – Dan primjene rec.-hCG	-3.368	0.002	-1.908	0.169
2. dan ciklusa – dan primjene rec.-hCG	-2.449	0.043	-2.269	0.070
<b>E2</b>				
2. dan ciklusa – dan uvođenja GnRH antagonista	-5.103	<0.001	-4.899	<0.001
Dan uvođenja GnRH antagonista – Dan primjene rec.-hCG	-4.185	<0.001	-9.334	<0.001
2. dan ciklusa – dan primjene rec.-hCG	-9.288	<0.001	-4.435	<0.001
<b>P4</b>				
2. dan ciklusa – dan uvođenja GnRH antagonista	0.612	0.540	-0.782	0.434
Dan uvođenja GnRH antagonista – Dan primjene rec.-hCG	-4.287	<0.001	-5.161	<0.001
2. dan ciklusa – dan primjene rec.-hCG	-3.674	<0.001	-4.379	<0.001

\* Wilcoxonov post hoc test

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

SD – standardna devijacija

Rec.-hCG - rekombinantni hCG

N – broj ispitanica

### 5.3. Ishodi postupka MPO

Od ukupno 100 pacijentica uključenih u istraživanje, četrnaest ispitanica je postiglo kliničku trudnoću, koja je potvrđena ultrazvučno nakon šest tjedana amenoreje. U jedne pacijentice u fiksnom protokolu i jedne pacijentice u fleksibilnom protokolu pozitivan nalaz beta hCG-a mjerenog 14 dana nakon embriotransfera jest završio biokemijskom trudnoćom. Postotak klinički ostvarene trudnoće u istraživanju stoga iznosi 14%. Od 14 trudnoća, osam je zabilježeno u skupini koja je primila fiksni protokol ( $8/50 = 16\%$ ), dok je šest trudnoća zabilježeno u skupini koja je primila fleksibilni protokol ( $6/50 = 12\%$ ). Međutim, rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku između dviju skupina ( $P=0.564$ ). U tri ispitanice koje su primile fiksni protokol te u 2 ispitanice koje su primile fleksibilni protokol, došlo je do zadržanog pobačaja prije 12. tjedna amenoreje. Analizom rezultata nisu utvrđene statistički značajne razlike u broju oocita i broju oocita u metafazi II između dvaju protokola. Prosječan broj dobivenih zrelih oocita u skupini pacijentica s fiksnim protokolom iznosio je 2.7, dok je u fleksibilnom protokolu taj broj iznosio 1.2 ( $P = 0.708$ ). Također, nije bilo statistički značajnih razlika u broju dobivenih embrija između dviju skupina.

Prosječno je 1 embrij vraćen u maternicu u obje skupine pacijentica treći ili peti dan nakon aspiracije folikula.

**Tablica 12.** Ishodi IVF postupka (N=100).

	Fiksni GnRH antagonistički protokol	Fleksibilni GnRH antagonistički protokol	P*
<b>Broj pozitivnih aspiracija, n (%)</b>	45 (86)	46 (92)	
<b>Broj dobivenih oocita</b>			
Prosjek (SD)	3.6 (2.99)	3.2 (2.48)	0.614
Medijan (raspon)	3 (3, 2-5)	3 (3, 1-4)	
<b>Broj MII oocita</b>			
Prosjek (SD)	2.7 (2.5)	1.2 (1.0)	0.708
Medijan (raspon)	2 (2, 1-3)	1 (2, 0-2)	
<b>Broj dobivenih embrija</b>			
Prosjek (SD)	1.3 (1.1)	1.2 (1.0)	0.698
Medijan (raspon)	1 (2, 0-2)	1 (2, 0-2)	
<b>Broj transferiranih embrija po ciklusu</b>			
Prosjek (SD)	1.0 (0.8)	0.8 (0.8)	0.101
Medijan (raspon)	1 (2, 0-2)	1 (2, 0-2)	
<b>Dan ET</b>			
Prosjek (SD)	2.7 (1.9)	1.9 (2.0)	0.058
Medijan (raspon)	3 (5, 0-5)	1.5 (3, 0-3)	
<b>Trudnoća ultrazvučno potvrđena , n</b>	8 (16)	6 (12)	0.564
<b>Pobačaj, n</b>	3	2	
<b>Uzrok pobačaja, n</b>			
Blighted ovum	0	0	
Zadržani pobačaj	3	2	

\* Mann-Whitney test

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

SD – standardna devijacija

N – broj ispitanica

MI – oocita u metafazi II

ET – embriotransfer

U jedne pacijentice u fiksnom protokolu od postupka stimulacije ovulacije se odustalo zbog izostanka folikulogeneze (2%).

Broj negativnih aspiracija u skupini pacijentica s fiksnim protokolom iznosio je 5, u usporedbi s 4 pacijentice u skupini s fleksibilnim protokolom. U fiksnom protokolu, od postupka se odustalo u dvije pacijentice zbog neadekvatnih oocita, u fleksibilnom u jedne pacijentice. Dodatno, u 13 pacijentica nije došlo do oplodnje nakon IVF/ICSI postupka. U istraživanju, dakle u 26% pacijentica nije učinjen embriotransfer (u fiksnom protokolu 26% ispitanica, u fleksibilnom protokolu 26% ispitanica).

**Tablica 13.** Odustajanje od postupka stimulacije i razlog odustajanja.

	Fiksni GnRH antagonistički protocol (N=50)	%	Fleksibilni GnRH antagonistički protocol (N=50)	%
Izostanak folikulogeneze, n	1	2	0	0
Negativna aspiracija, n	5	10	4	8
Nezrele oocite, n	2	4	1	2
Izostanak oplodnje, n	5	10	8	16

#### 5.4. Analiza podskupina prema vrsti GnRH antagonističkog protokola i statusa ostvarene trudnoće

Razlike između promatranih skupina u fiksnom i fleksibilnom protokolu sa i bez ostvarene trudnoće prikazane su u narednim tablicama. Između navedenih skupina deskriptivno su opisane nezavisne varijable (tablica 14), dok su univarijantnom analizom varijance pronađene statistički značajne razlike varijabli između navedenih skupina (tablica 15, 16, 17, 18). U daljnjem tekstu varijable su prijavljene medijanom.

Prema dobi, primjećuje se da su pacijentice u skupini fleksibilnog protokola s postignutom trudnoćom bile najstarije (medijan 40 godina), zatim slijede pacijentice u skupini fleksibilnog protokola bez ostvarene trudnoće (medijan 39 godina), fiksnog protokola s postignutom trudnoćom (medijan 38 godina), dok su pacijentice u skupini fiksnog protokola bez ostvarene trudnoće bile najmlađe (medijan 37 godina). Međutim, nije bilo statistički značajnih razlika u dobi između navedenih skupina.

Prema medijanu broja antralnih folikula, primjećuje se slična raspodjela vrijednosti između skupina. Međutim, prema aritmetičkoj sredini, primjećuje se razlika između skupina, s najvišom srednjom vrijednosti u skupini fiksnog protokola s postignutom trudnoćom (prosječno 4.9), zatim fiksnog protokola bez ostvarene trudnoće (prosječno 4.1), fleksibilnog protokola s postignutom trudnoćom (prosječno 4.1), te najnižom srednjom vrijednosti u skupini fleksibilnog protokola bez ostvarene trudnoće (prosječno 3.8). Ipak, nije bilo statistički značajnih razlika u broju antralnih folikula između navedenih skupina.

U pogledu anti-Müllerovog hormona, prikazane su razlike među skupinama, s višim razinama AMH-a u skupinama s postignutom trudnoćom (fiksni protokol; medijan 5.7 pmol/L, fleksibilni protokol; medijan 4.8 pmol/L) u usporedbi sa skupinama bez ostvarene trudnoće (fiksni protokol; medijan 4.35, fleksibilni protokol; medijan 3.6). Međutim, nije bilo statistički značajnih razlika u razinama AMH-a između skupina.

Prema bazalnim vrijednostima prolaktina, primjećuje se nešto viša vrijednost PRL-a u skupinama s fiksnim protokolom (bez ostvarene trudnoće; medijan 266 mIU/L, s ostvarenom trudnoćom; medijan 262 mIU/L) u usporedbi sa skupinama s fleksibilnim protokolom (bez ostvarene trudnoće; medijan 256, s ostvarenom trudnoćom; medijan 168). Navedene razlike u vrijednostima PRL-a između skupina nisu bile statistički značajne.

U pogledu bazalnih vrijednosti tiroidnog stimulirajućeg hormona nisu pronađene statistički značajne razlike između skupina.

**Tablica 14.** Bazalni parametri po podskupinama prema statusu ostvarene trudnoće.

Varijabla	Fiksni protokol bez ostvarene trudnoće (N=42)	Fiksni protokol s ostvarenom trudnoćom (N=8)	Fleksibilni protokol bez ostvarene trudnoće (N=44)	Fleksibilni protokol s ostvarenom trudnoćom (N=6)	P
<b>Dob</b>					
Mean (SD)	38.1 (3.1)	37.6 (1.9)	38.2 (3.6)	38.5 (4.0)	0.789
Median (25.-75.)	38 (36-41)	37 (36.2-39.5)	39 (35-41)	40 (33.7-42)	
<b>AFC</b>					
Mean (SD)	4.1 (1.7)	4.9 (2.1)	3.8 (1.5)	4.1 (1.3)	0.627
Median (25.-75.)	4 (3-5.25)	4 (3-7)	4 (3-5)	4 (3.5-5.25)	
<b>AMH</b>					
Mean (SD)	4.2 (2.2)	5.7 (2.1)	4.4 (2.4)	4.8 (2.2)	0.334
Median (25.-75.)	4.35 (2-6.4)	5.7 (3.7-7.6)	3.6 (2.8-5.9)	4.8 (2.7-7.0)	
<b>PRL</b>					
Mean (SD)	318.66 (156.76)	283 (115.86)	259.61 (95.0)	179.5 (71.4)	0.092
Median (25.-75.)	266 (196.75-430.5)	262 (210.5-399.7)	256.5 (191.25-318.5)	168.5 (125.2229.7)	
<b>TSH</b>					
Mean (SD)	1.77 (0.64)	1.41 (0.69)	1.69 (0.73)	2.22 (1.32)	0.507
Median (25.-75.)	1.65 (1.38-2.28)	1.58 (0.81-1.94)	1.48 (1.1-2.3)	1.96 (1.17-3.23)	

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

SD – standardna devijacija

N – broj ispitanica

Promatrajući početni dana primjene GnRH antagonista, prikazane su statistički značajne razlike između skupina ( $P < 0.001$ ) (tablica 15), koje prate rezultate analize glavnih skupina. Daljnje post hoc testiranje (Tablica 16) otkrilo je dodatne statistički značajne razlike između parova skupina: fiksnog i fleksibilnog protokola bez ostvarene trudnoće te fiksnog protokola s ostvarenom trudnoćom i fleksibilnog protokola bez ostvarene trudnoće.

Iako je analiza glavnih skupina pokazala da su pacijentice u skupini fiksnog protokola značajno dulje primjenjivale GnRH antagonist, analiza podskupina je pokazala da su pacijentice u skupini fleksibilnog protokola s ostvarenom trudnoćom najdulje koristile GnRH antagonist (medijan 7 dana,  $P = 0.001$ ). Nadalje, post hoc testiranje je otkrilo stvarne statistički značajne razlike između parova skupina: fiksni protokol s ostvarenom trudnoćom i fleksibilni protokol bez ostvarene trudnoće te između skupina fleksibilnog protokola s i bez ostvarene trudnoće.

Prema početnoj dozi primijenjenih gonadotropina, rezultati analize podskupina slijede rezultate analize glavnih skupina, gdje nije bilo statistički značajnih razlika između četiri skupine. Međutim, prikazane su statistički značajne razlike između skupina u trajanju primjene i ukupnoj dozi gonadotropina. Ovi rezultati sugeriraju da su skupine pacijentica s ostvarenom trudnoćom duže primjenjivale gonadotropine u odnosu na skupine istog protokola bez ostvarene trudnoće. Post hoc testiranje je otkrilo statistički značajne razlike između parova skupina: fiksni i fleksibilni protokol bez ostvarene trudnoće (medijani 11 i 10 dana) te skupina fiksnog protokola bez ostvarene trudnoće i fleksibilnog protokola s ostvarenom trudnoćom (medijani 11 i 13 dana). Nadalje, u pogledu ukupne primijenjene doze FSH-a, primijećene su stvarne razlike između skupina fiksnog i fleksibilnog protokola bez ostvarene trudnoće, s većom primljenom dozom gonadotropina u skupini fleksibilnog protokola.

**Tablica 15.** Analiza parametara stimulacije ovulacije u podskupinama prema statusu ostvarene trudnoće i Kruskal-Wallis analiza varijance.

Varijabla	Fiksni protokol bez ostvarene trudnoće (N=42)	Fiksni protokol s ostvarenom trudnoćom (N=8)	Fleksibilni protokol bez ostvarene trudnoće (N=44)	Fleksibilni protokol s ostvarenom trudnoćom (N=6)	P*
<b>Dan uvođenja GnRH antagonista</b>					
Mean (SD)	7 (0)	7 (0)	9.05 (1.76)	8.17 (1.3)	<0.001
Median (25.-75.)	7 (7-7)	7 (7-7)	9 (8-10)	8 (7.5-9.2)	
<b>Ukupno dana primjene GnRH antagonista</b>					
Mean (SD)	4.55 (1.72)	5.38 (1.2)	3.64 (1.52)	6.17 (1.7)	0.001
Median (25.-75.)	4 (3-6)	5.5 (5-6)	3 (2.25-4)	7 (4-7.25)	
<b>Početna doza gonadotropina (IU)</b>					
Mean (SD)	278.5 (41.5)	290.6 (26.5)	278.9 (37.6)	275 (61.2)	0.887
Median (25.-75.)	300 (281.25-300)	300 (300-300)	300 (225-300)	300 (262.5-300)	
<b>Trajanje primjene gonadotropina (dan)</b>					
Mean (SD)	9.0 (1.8)	10.4 (1.3)	10.52 (1.99)	12.5 (2.1)	0.001
Median (25.-75.)	9 (7.75-10)	11 (9.2-11)	10 (9-12)	13 (10.5-14.2)	
<b>Ukupna doza primijenjenih gonadotropina (IU)</b>					
Mean (SD)	2482.14 (581.14)	2953.13 (469.15)	2946.59 (754.8)	3425 (969.4)	0.008
Median (25.-75.)	2400 (2100-3000)	3000 (2493.7-3300)	2700 (2400-3300)	3600 (2512.5-4275)	

\*Kruskal-Wallisov test

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

SD – standardna devijacija

N – broj ispitanica



**Tablica 16.** Razlike između parova podskupina prema ostvarenoj trudnoći - post hoc test s Bonferroni korekcijom kao dodatak Kruskal-Wallis analizi varijance.

Varijabla	Test statistic	P
<b>Dan uvođenja GnRH antagonista</b>		
1-3	-7.851	< 0.001
2-3	-4.347	< 0.001
<b>Ukupno primijenjenog GnRH antagonista</b>		
3-2	2.755	0.035
3-4	-3.212	0.008
<b>Ukupna doza primijenjenih gonadotropina</b>		
1-3	-2.697	0.042
<b>Trajanje primjene gonadotropina</b>		
1-3	-3.076	0.013
1-4	-3.390	0.004
<b>P4 na dan uvođenja antagonista</b>		
2-4	-2.786	0.032

\* post-hoc Bonferroni test

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

SD – standardna devijacija

N – broj ispitanica

1. Fiksni protokol bez ostvarene trudnoće
2. Fiksni protokol s ostvarenom trudnoćom
3. Fleksibilni protokol bez ostvarene trudnoće
4. Fleksibilni protokol s ostvarenom trudnoćom

Prema vrijednostima FSH promatrane unutar četiri skupine, prikazane su slične razine hormona bez statistički značajne razlike među skupinama.

Kada pogledamo kretanje razina LH-a, nisu prikazane statistički značajne razlike između skupina u svim točkama mjerenja. Međutim, vide se nešto više razine LH mjenjenog drugog dana menstrualnog ciklusa u skupinama fiksnog protokola, dok se na razinama hormona mjenjenih tijekom ciklusa i na dan primjene rekombinantnog hCG-a vide više razine u skupinama fleksibilnog protokola.

**Tablica 17.** Analiza FSH i LH tijekom stimulacije ovulacije u podskupinama prema ostvarenoj trudnoći.

Varijabla	Fiksni protokol bez ostvarene trudnoće (N=42)	Fiksni protokol s ostvarenom trudnoćom (N=8)	Fleksibilni protokol bez ostvarene trudnoće (N=44)	Fleksibilni protokol s ostvarenom trudnoćom (N=6)	P*
<b>FSH 2. dan stimulacije</b>					
Mean (SD)	7.78 (3.19)	8.8 (3.1)	8.8 (2.7)	9.9 (6.2)	0.589
Median (25.-75.)	8.1 (6.4-9.8)	9.55 (5.5-11.6)	8.9 (6.9-10.6)	8.4 (6-12.7)	
<b>LH 2. dan stimulacije</b>					
Mean (SD)	4.97 (4.29)	4.82 (2.03)	3.99 (1.64)	3.7 (0.7)	0.501
Median (25.-75.)	4.25 (2.7-6.2)	4.25 (3.35-5.4)	3.65 (2.82-4.97)	3.7 (2.9-4.5)	
<b>LH na dan uvođenja antagonista</b>					
Mean (SD)	4.89 (5.49)	3.04 (0.91)	4.69 (4.06)	4.6 (1.2)	0.401
Median (25.-75.)	3.4 (2.75-6)	3.05 (2.2-3.85)	4.1 (2.3-5.025)	4.5 (3.4-5.8)	
<b>LH na dan primjene rec.-hCG-a</b>					
Mean (SD)	6.32 (5.5)	3.88 (1.16)	4.86 (4.22)	5.3 (1.1)	0.061
Median (25.-75.)	5 (4.1-6.5)	3.55 (3-4.45)	4.05 (2.15-5.42)	5.6 (4.6-6.2)	

\*Kruskal-Wallisov test

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

SD – standardna devijacija

N – broj ispitanica

Prikazana je statistički značajna razlika između skupina u vrijednostima estradiola mjerenih na dan primjene rekombinantnog hCG-a ( $P = 0.030$ ). Prethodna mjerenja, premda bez statističke značajnosti, pokazala su više razine E2 u skupinama fiksnog protokola bez ostvarene trudnoće te fleksibilnog protokola s ostvarenom trudnoćom. Međutim, post hoc analiza nije pokazala stvarne razlike između parova skupina u vidu značajnih razlika razina hormona na dan primjene r-hCG-a.

Također, pronađena je statistički značajna razlika u vrijednostima progesterona mjerenih tijekom ciklusa ( $P = 0.024$ ). Naknadnom post hoc analizom može se vidjeti stvarna razlika između skupina fiksnog i fleksibilnog protokola s ostvarenom trudnoćom ( $P = 0.032$ ), gdje je izmjerena viša razina P4 u skupini fleksibilnog u odnosu na fiksni protokol (medijan 1.6 nmol/L prema medijanu 0.75 nmol/L).

**Tablica 18.** Analiza estradiola i progesterona tijekom stimulacije ovulacije u podskupinama prema ostvarenoj trudnoći.

Varijabla	Fiksni protokol bez ostvarene trudnoće (N=42)	Fiksni protokol s ostvarenom trudnoćom (N=8)	Fleksibilni protokol bez ostvarene trudnoće (N=44)	Fleksibilni protokol s ostvarenom trudnoćom (N=6)	P*
<b>E2 2. dan stimulacije</b>					
Mean (SD)	238.7 (173.2)	157.5 (59.4)	181.4 (94.1)	295.3 (172.1)	0.070
Median (25.-75.)	188 (146-260)	149.5 (105.5-179.5)	166.5 (125.5-246)	277 (170.2-410.25)	
<b>P4 2.dan stimulacije</b>					
Mean (SD)	1.19 (0.63)	0.95 (0.35)	1.6 (2.4)	1.05 (0.41)	0.614
Median (25.-75.)	1.05 (0.77-1.35)	0.8 (0.6-1.4)	1.1 (0.8-1.6)	1 (0.7-1.45)	
<b>E2 na dan uvođenja antagonista</b>					
Mean (SD)	1714.32 (1117.97)	1561.62 (649.18)	1810.28 (1698.7)	3010.5 (2675.8)	0.366
Median (25.-75.)	1777 (851-2166.5)	1473.5 (929-2248.7)	1400 (754.25-2192.25)	2337.5 (1270.5-4153.5)	
<b>P4 na dan uvođenja antagonista</b>					
Mean (SD)	1.27 (0.88)	0.85 (0.32)	1.46 (0.90)	1.5 (0.3)	0.024
Median (25.-75.)	1.1 (0.9-1.4)	0.75 (0.62-1.37)	1.2 (0.9-1.85)	1.6 (1.3-1.7)	
<b>E2 na dan primjene rec.-hCG-a</b>					
Mean (SD)	3346.61 (2388.91)	4632.5 (1669.7)	3394.33 (2942.9)	5817.1 (2990.5)	0.030
Median (25.-75.)	3182 (1494-4614)	4160.5 (3435.5-5518)	2690 (1545.7-4035.7)	5279.5 (3383.7-9122.2)	
<b>P4 na dan primjene rec.-hCG-a</b>					
Mean (SD)	1.79 (1.37)	1.8 (0.8)	3.15 (3.6)	2.03 (0.85)	0.058
Median (25.-75.)	1.5 (0.95-2.15)	1.55 (1.2-2)	1.9 (1.4-2.9)	1.7 (1.4-2.8)	

\*Kruskal-Wallisov test

P – razina statističke značajnosti, P < 0,05 SD – standardna devijacija N – broj ispitanica

Premda je analizom varijance pronađena statistička značajnost, za broj MII oocita post hoc testom ne vidi se stvarna razlika između skupina.

**Tablica 19.** Broj oocita metafaze II (MII) u podskupinama prema ostvarenoj trudnoći.

Varijabla	Fiksni protokol bez ostvarene trudnoće (N=42)	Fiksni protokol s ostvarenom trudnoćom (N=8)	Fleksibilni protokol bez ostvarene trudnoće (N=44)	Fleksibilni protokol s ostvarenom trudnoćom (N=6)	P*
<b>MII oocite</b>					
Mean (SD)	2.4 (2.5)	3.7 (1.8)	2.2 (1.8)	4.2 (2.6)	0.038
Median (25.-75.)	2 (1-3)	3.5 (2.2-5.7)	2 (1-4)	4 (2.5-5.2)	

\*Kruskal-Wallisov test

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

SD – standardna devijacija

N – broj ispitanica

MII – oocite u metafazi II

Linearnim regresijskim modelom pokušalo se uočiti postoji li utjecaj koncentracija LH, E2, P4 na dan uvođenja antagonista na broj MII oocita, ovisno o vrsti korištenog GnRH-a protokola (Tablica 20). Uočena je statistička značajnost prediktornog modela ( $P < 0.001$ ), ali s slabim efektom skupa prediktora na broj dobivenih MII oocita ( $R^2 = 0.179$ ), što bi značilo da se 17.9% varijance broja MII oocita može objasniti ovim skupom prediktora. Shodno tome, možemo reći da vrsta korištenog GnRH-a protokola, te hormoni E2, LH, P4 na dan uvođenja antagonista imaju slab efekt na broj dobivenih MII oocita ( $P < 0.001$ ).

Prema B koeficijentima možemo vidjeti prirodu odnosa prediktora na mjerenu varijablu. Iz modela je vidljivo da najveći utjecaj imaju vrijednosti E2 na dan uvođenja antagonista ( $P < 0.001$ ), što je pokazano kao statistički značajna povezanost. Dakle, za svako jedinično povećanje vrijednosti E2, vidimo smanjenje broja MII oocita za 0.440 (95% CI -0.172, 0.517;  $P < 0.001$ ).

**Tablica 20.** Linearni regresijski model utjecaja koncentracije LH, E2, P4 na dan uvođenja GnRH antagonista na broj MII oocita.

Prediktorna varijabla	B koeficijent	P	95% CI
Vrsta GnRH antagonističkog protokola	-0.327	0.444	-1.172, 0.517
E2	-0.440	< 0.001	-0.164, 0.371
LH	-0.127	0.180	-0.161, 0.031
P4	-0.172	0.102	-1.045, 0.095

\*ANOVA ( $F = 5.192$ ,  $P < 0.001$ );  $R^2 = 0.179$ .

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

CI interval pouzdanosti

Logističkim regresijskim modelom pokušalo se predvidjeti utjecaj bazalnih vrijednosti E2, LH, FSH, PRL, TSH, AFC, AMH i dobi na izbor antagonističkog protokola (Tablica 21). Premda model nije pokazao statističku značajnost ( $P = 0.184$ ), iz modela se može vidjeti utjecaj vrijednosti prolaktina prije početka stimuliranog ciklusa na izbor antagonističkog protokola. Naime, iz modela je vidljivo da za svako jedinično povećanje vrijednosti prolaktina vidimo smanjenje izgleda od 0.4% za izbor fleksibilnog protokola, odnosno suprotno povećanje izgleda za izbor fiksnog antagonističkog protokola (95% CI 0.992, 1.000;  $P = 0.032$ ).

**Tablica 21.** Logistički regresijski model utjecaja bazalnih parametara na izbor GnRH antagonističkog protokola.

Prediktorna varijabla	B koeficijent	OR	P	95% CI
Dob	0.017	1.017	0.804	0.890, 1.162
AFC	-0.252	0.777	0.087	0.583, 1.037
AMH	0.077	1.080	0.452	0.883, 1.321
PRL	-0.004	0.996	0.032	0.992, 1.000
TSH	-0.053	0.948	0.855	0.534, 1.682
FSH prije ciklusa	0.036	1.037	0.546	0.923, 1.165
E2 prije ciklusa	-0.002	0.998	0.304	0.994, 1.002
LH prije ciklusa	-0.118	0.889	0.289	0.714, 1.105

Nagelkerke  $R^2 = 0.143$ ;  $P = 0.184$

Fleksibilni antagonistički protokol označen kao „ishod 1“.

P – razina statističke značajnosti,  $P < 0,05$

CI interval pouzdanosti

## 6. RASPRAVA

U žena sa slabim ovarijskim odgovorom postupak stimulacije ovulacije rezultira manjim brojem dobivenih kvalitetnih oocita te smanjenim brojem kvalitetnih embrija primjerenih za embriotransfer zbog čega je vjerojatnost postizanja uspješne trudnoće i rađanja zdravog djeteta manja (168). U usporedbi sa ženama s normalnim ovarijskim odgovorom, postotak trudnoće u ovoj skupini pacijentica iznosi prosječno 14,8%, dok je uspješnost postupka in vitro oplodnje kod žena s normalnim odgovorom 34,5% (87). U našem istraživanju postotak ostvarene trudnoće iznosio je 14%, što je u skladu s dosad poznatim podacima (168–175).

Pravilno postupanje u pacijentica sa smanjenom ovarijskom rezervom predstavlja veliki izazov u kliničkoj praksi. U protekla dva desetljeća, različite metode liječenja i protokoli stimulacije ovulacije bili su evaluirani u pacijentica sa slabim odgovorom na stimulaciju ovulacije. Međutim, još uvijek nema konsenzusa o najučinkovitijem protokolu te nijedan protokol do sada nije pokazao superiornost u odnosu na druge (176) te konvencionalni IVF ostaje zlatni standard u liječenju ove skupine pacijentica.

Tijekom ovarijske stimulacije, GnRH analozi – GnRH antagonisti i agonisti koriste se za supresiju hipofize i prevenciju prijevremene luteinizacije blokirajući lučenje endogenog LH. Prijevremeni porast LH javlja se u 20% gonadotropinima stimuliranih ciklusa (177).

Primjena GnRH agonista tijekom ovarijske stimulacije moguća je u nekoliko protokola, od kojih su najčešće upotrebljavani dugi i kratki protokol. U kratkom GnRH agonističkom protokolu inicijalno poticanje hipofize na sekreciju gonadotropina (*engl. flare-up effect*) koristi se za poticanje rasta folikula u folikularnoj fazi. GnRH agonisti zajedno s egzogenim gonadotropinima koriste se od drugog dana menstrualnog ciklusa do apliciranja hCG-a. U dugom protokolu, primjena GnRH agonista započinje ranije, počevši od 21. dana prethodnog menstrualnog ciklusa, s ciljem postizanja supresije hipofize („down regulacije“) prije primjene egzogenih gonadotropina. Nakon supresije hipofize započinje se egzogenom primjenom gonadotropina zajedno sa GnH agonistima koji se apliciraju do dana primjene hCG-a. U općoj populaciji žena podvrgnutima postupcima MPO, dugi protokol pokazao se efikasniji od kratkog protokola i zbog toga se češće upotrebljava (178). Iako su prvobitna istraživanja pokazivala obećavajuće rezultate kod primjene dugog protokola u pacijentica sa slabim odgovorom na stimulaciju ovulacije (179–182), uskoro su novije studije tu činjenicu demantirale (183). U velikom broju slučajeva supresija jajnika primjenom GnRH agonista dovela je do neadekvatnog



odgovora i do refrakternosti jajnika na egzogenu primjenu gonadotropina (184–186). S druge strane, primjena GnRH agonista na početku folikularne faze u kratkom protokolu, koja dovodi do porasta endogenih gonadotropina („flare-up“), smatrala se boljom opcijom u ovoj skupini pacijentica (187,188). Međutim, istraživanja su pokazala da zbog djelovanja endogenih gonadotropina dolazi do prekomjernog lučenja androgena, povišene razine progesterona te posljedično pada broja folikula i kvalitete oocita (189,190). U "micro-dose" protokolu, primjenjuju se niže doze GnRH agonista od uobičajenog kratkog protokola, koje su dovoljne da potaknu lučenje endogenih gonadotropina, ali pritom smanjuju mogućnost pojačanog lučenja progesterona i androgena kakvo je zabilježeno u tradicionalnim kratkim protokolima. Iako najniža doza GnRH agonista koja može potaknuti oslobađanje gonadotropina kod ljudi nije sigurno određena, doze od 20 do 40 µg leuprorelin acetata dva puta dnevno, s ili bez suplementacije hormonom rasta, uspješno su korištene u tu svrhu (191–193). Temeljem navedenih saznanja, Weissman u svojoj studiji uspoređuje dva protokola, modificirani kratki protokol i modificirani dugi agonistički protokol s niskim dozama GnRH agonista. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na veću uspješnost dugog protokola koji uključuje primjenu 100 µg GnRH agonista od 21. dana ciklusa do početka menstruacije i postizanja down-regulacije hipofize. Nakon toga slijedi primjena 50 µg uz dodatak gonadotropina od 3. dana menstrualnog ciklusa. Ovaj protokol je pokazao bolje rezultate u usporedbi s modificiranim kratkim protokolom koji uključuje primjenu 500 µg triptorelina od 2. dana menstrualnog ciklusa tijekom 4 dana, a zatim 100 µg do injekcije hCG-a, uz primjenu gonadotropina od 3. dana menstrualnog ciklusa (94). Iako se broj oocita dobivenih u modificiranom dugom protokolu s niskim dozama GnRH agonista pokazao statistički značajno većim, zbog malog uzorka, razlika u broju postignutih trudnoća nije se pokazala statistički značajnom.

Cochranova meta analiza iz 2016., koje je uključivala 73 randomizirana kontrolirana pokusa i obuhvaćala 12,212 ispitanica u postupcima in vitro oplodnje, potvrđuje ranije opažanja da se broj živorođenih po postupku ne razlikuje kod primjene GnRH agonističkog i antagonističkog protokola, dok je u GnRH antagonističkom protokolu zabilježena značajno manja incidencija pojave ovarijskog hiperstimulacijskog sindroma (14). Stoga, autori bazirajući se na poznatim rezultatima zaključuju da je GnRH antagonistički protokol u ukupnoj populaciji koja je u postupcima in vitro oplodnje, jednako učinkovit kao i dugi GnRH agonistički protokol, uz veću sigurnost i bolju suradljivost pacijentica (14).

Istraživanjem koje je provedeno još 2014. godine pokazalo se da ne postoji razlika u broju trudnoća između dva standardna protokola stimulacije jajnika, GnRH agonističkog i GnRH antagonističkog, u pacijentica s slabim odgovorom jajnika (92).

U dva randomizirana kontrolirana pokusa koja su uključivala 90 i 440 pacijentica sa slabim odgovorom jajnika, uspoređen je učinak kratkog GnRH agonističkog protokola s niskom dozom agonista i GnRH antagonističkog protokola (194,195). Demirel i suradnici nisu pronašli razlike u broju kliničkih trudnoća (28,6%, 12 trudnoća od 42 ispitanice) prema 15% (6 trudnoća od 40 ispitanica), iako je značajno manji broj dobivenih zrelih oocita zabilježen u antagonističkom protokolu ( $4,3 \pm 2,1$  prema  $3,1 \pm 1,1$ ) (194). Merviel i suradnici nisu pronašli značajne razlike u broju kliničkih trudnoća (14,6% u odnosu na 14,2%) niti u broju aspiriranih jajnih stanica ( $6,0 \pm 4,1$  naspram  $6,2 \pm 4,9$ ) (195).

U sklopu meta analize provedene 2017. godine koja je uključivala skupinu pacijentica sa normalnim, prenatlašenim i slabim ovarijskim odgovorom potvrđeni su ovi rezultati. U skupini pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom pronađena su šest randomizirana kontrolirana pokusa u kojih se uspoređivao učinak GnRH agonističkog sa fiksnim ili fleksibilnim GnRH antagonističkim protokolom. Na ukupnom broju od 780 ispitanica, nisu pronađene razlike u broju trudnoća nakon 12. tjedna amenoreje (RR 0.87, 95% CI 0.65–1.17), broju živorođenih (RR 0.89, 95% CI 0.56–1.41, n=544), broju kliničkih trudnoća (RR 0.85, 95% CI 0.66–1.10, n=780) kao ni u broju dobivenih oocita (93). Iako su neka istraživanja pokazala da je broj zrelih oocita veći nakon primjene dugog GnRH agonističkog protokola, razlika se nije pokazala statistički značajnom i ovaj protokol se nije pokazao superiornijim u odnosu na GnRH antagonistički protokol (95).

U žena sa smanjenim ovarijskom odgovorom ne postoji rizik od razvoja OHSS-a kao ni razlika u efikasnosti između dugog GnRH agonističkog i GnRH antagonističkog protokola, međutim kod primjene antagonističkog protokola potrebna je kraća stimulacija zbog čega je i suradljivost pacijentica veća (80). Stoga se, prema smjernicama Europskog društva za humanu reprodukciju i embriologiju za pacijentice s očekivanim slabim ovarijskim odgovorom jednako preporuča primjena GnRH agonista kao i GnRH antagonista (77).

Dvije vrste GnRH antagonističkog protokola koriste se tijekom ovarijske stimulacije u postupcima medicinski potpomognute oplodnje. Razlikujemo fiksni protokol kod kojeg se antagonist uvodi šesti dan stimulacije te fleksibilni protokol (196). Najčešće korišten način je fiksno uvođenje GnRH antagonista kako bi se izbjegao rizik od prijevremene sekrecije LH i

pojednostavio protokol stimulacije. Budući da postoje individualne varijacije u odgovoru pacijentica na stimulaciju ovulacije, početak terapije s GnRH antagonistom prema veličini folikula i razini hormona (fleksibilni protokol) može biti od koristi. Kod fleksibilnog protokola, uvođenje antagonista najčešće ovisi o ultrazvučnom nalazu, kada najveći folikul dosegne određenu veličinu, između 12 i 14 mm i/ ili kada razina hormona dosegne određenu koncentraciju (196). Najčešće navedeni kriteriji prema hormonskom statusu su razina estradiola po folikulu veća od 150 ili veća od 200 pg/mL i/ili razina LH veća ili jednaka 10 IU/L (22,23,197–201). Prema istraživanju Al-Inany i suradnika, uvođenje GnRH antagonista u fleksibilnom protokolu trebalo bi se temeljiti isključivo na veličini folikula (202), obzirom na činjenicu da su razine estradiola u postupcima s GnRH antagonistima niže u usporedbi s GnRH agonistima (203). Prema ovim autorima, vrijeme primjene humanog korionskog gonadotropina treba odabrati na temelju veličine vodećeg folikula, a ne na temelju koncentracije estradiola. S obzirom na nedosljednost kriterija uvođenja antagonista u fleksibilnom protokolu, jasno definiranje i usporedba rezultata jest otežana (23).

U oba antagonistička protokola, primjena oralnih hormonskih kontraceptiva (OHK), progestina ili estradiola prije početka terapije može se koristiti kako bi se postigla sinkronizacija razvoja folikula, spriječio spontani porast LH, smanjio rizik od nastanka cista te olakšalo planiranje IVF ciklusa u korist kliničara i pacijenata (204). Međutim, istraživanja su pokazala da primjena OHK prije stimulacije može rezultirati smanjenom stopom trudnoće u usporedbi s protokolima bez pred tretmana oralnim hormonskim kontraceptivima (205). Nadalje, smjernice ESHRE-a iz 2020. godine navode da prethodna terapija estrogenom ili progestinima prije korištenja protokola s GnRH antagonistom "vjerojatno nije preporučljiva" radi poboljšanja učinkovitosti i sigurnosti, te da prethodna terapija OHK-om u trajanju od 12-28 dana nije preporučljiva u protokolu s GnRH antagonistom zbog smanjenog učinka (77).

Tek nekoliko studija uspoređuje učinkovitost fiksnog i fleksibilnog GnRH antagonističkog protokola. U sustavnom pregledu literature i meta analizi objavljenoj 2023., Venetis i suradnici istražuju efikasnost ovih protokola s ciljem pronalaženja optimalnijeg protokola po broju postignutih trudnoća (206). Pronađeno je 7 kontroliranih randomiziranih pokusa koji su uspoređivali broj trudnoća do 12. tjedna amenoreje dok ni jedna nije uspoređivala broj živorođenih. Od 7 studija, u njih 6 u fiksnom protokolu antagonist je uveden šesti dan stimulacije ovulacije (22,23,197–200) dok je u jedne GnRH antagonist uveden 5. dan stimulacije ovulacije (201). Statistički značajno manji broj trudnoća zabilježen je u fleksibilnom protokolu (RR 0.76, 95% CI 0.62-0.94, I<sup>2</sup> = 0%; n = 907 sudionica; dokazi niske

kvalitete). Međutim analizom pouzdanosti, nakon isključenja studija s nejasnim metodama randomizacije, nisu nađene značajne razlike između dva promatrana protokola (RR 0,73, 95% CI 0,55 do 0,97, I2 = 0%; 4 RCT studije; n = 663 sudionika) (23,198–200). Nije bilo statističke značajnosti u broju oocita između dva protokola (2.12 oocite, 95% CI –0.58-4.83; n = 961 sudionica; I2 = 93.8%; dokazi niske kvalitete) (9,10,176–180). Ova meta analiza uključivala je uglavnom pacijentice s normalnim odgovorom na stimulaciju ovulacije ili nespecificirane subpopulacije pacijentica te autor naglašava kako nema dovoljno dokaza za davanje preporuka u pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom (206).

U fleksibilnom protokolu, kasno uvođenje GnRH antagonista može rezultirati preuranjenim porastom estradiola što je povezano sa smanjenim brojem trudnoća u postupcima sa svježim embrio transferom zbog poremećene receptivnosti endometrija i neadekvatne zrelosti oocita (207). S druge strane, prerano uvođenje terapije GnRH antagonistima, kada su koncentracije estradiola manje od 300 pg/mL, može poremetiti mitotsko programiranje stanica uključenih u folikulogenezu (14) ili negativno utjecati na pripremu endometrija i implantaciju (207). Uvođenje antagonista u fleksibilnom protokolu može se primijeniti prije šestog dana stimulacije. U pacijentica kod kojih se rast folikula događa rano u ciklusu, pri fiksnom uvođenju antagonista moglo bi doći do prijevremenog porasta LH i prijevremene luteinizacije (22,198,208–211). Ukoliko je prisutan sporiji odgovor jajnika na primjenu gonadotropina (212,213) kakav se može vidjeti u pacijentica sa sindromom policističnih jajnika ili kod pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom, antagonist može biti primijenjen prerano u fiksnom protokolu (197).

Iako su istraživanja pokušala odgovoriti na pitanje kada je pravo vrijeme za primjenu GnRH antagonista u postupcima MPO u općoj populaciji žena koje su podvrgnute ovarijskoj stimulaciji (22,23,196,197,201,214,215), do sada, koliko nam je poznato, takva istraživanja nisu provedena u pacijentica sa slabim odgovorom jajnika. Glavni cilj našeg istraživanja bio je pružiti odgovor na pitanje o efikasnosti antagonističkog protokola u ovoj skupini pacijentica, pretpostavljajući da vrijeme primjene antagonista utječe na ishod postupka. Razlike u broju postignutih trudnoća u našem istraživanju nisu se pokazale statistički značajnima. Ovo može biti posljedica činjenice da je uspješnost postupka u ovoj skupini pacijentica niska, oko 14% (87), pa bi za postizanje značajnih rezultata bilo potrebno uključiti mnogo veći uzorak.

Prema ranije navedenim dokazima, uvođenje GnRH antagonista u našem istraživanju ponajviše se temeljilo na ultrazvučno izmjerenoj veličini folikula (202). GnRH antagonist u fleksibilnom protokolu uveden je kada su jedan ili dva folikula dosegla veličinu od 13-14

mm. Ranije navedeni dokazi potvrđuju kako nije bilo statistički značajne razlike u broju trudnoća između fiksnog i fleksibilnog protokola kada se u fleksibilnom protokolu za početak primjene GnRH antagonista koristio samo ultrazvučni kriterij veličine folikula (RR 0.68, 95% CI 0.36 do 1.32; I<sup>2</sup> = 0%; 3 RCT studije; n = 344 sudionika) (22,198,199) ili kada se koristila kombinacija ultrazvučnog nalaza i vrijednosti hormona (RR 0.81, 95% CI 0.58 do 1.14; I<sup>2</sup> = 0%; 3 RCT studije; n = 563 sudionika) (23,200,201).

U našem istraživanju pokazali smo da primjena GnRH antagonista u fleksibilnom protokolu započinje kasnije u odnosu na fiksni protokol, što se pokazalo statistički značajnim (9. dan u odnosu na 6. dan stimulacije ovulacije, P<0.001). Ova činjenica potvrđuje ranija opažanja da se u pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom bilježi kasniji porast folikula i, sukladno tome, kasnija potreba za uvođenjem GnRH antagonista (197).

Individualiziranim pristupom kod svake pacijentice kliničar odlučuje o dozi primjenjivanih gonadotropina. Vođeni koncentracijama hormona, prvenstveno AMH i FSH, zatim ultrazvučnim nalazom i ranijim odgovorom na stimulaciju ovulacije odabire se optimalna koncentracija lijekova u svakom postupku. U pacijentica sa slabim odgovorom jajnika, može se pretpostaviti da će biti potrebne veće doze gonadotropina kako bi se postigao veći broj jajnih stanica. Međutim, istraživanja su pokazala da genotip FSH receptora može imati utjecaj na intenzitet odgovora jajnika. Mayorga i suradnici su istraživali utjecaj dvije varijante FSH receptora, Thr307/Asn680 i Ala307/Ser680, na odgovor jajnika na egzogeno primijenjeni FSH (216) i uočili značajne razlike u potrebnoj dozi lijekova za uspješnu stimulaciju ovulacije. U istraživanju polimorfizma gena FSH receptora, Loutradis i suradnici su zaključili da postoji razlika u varijantama alela kod žena s slabim odgovorom jajnika te da se kod pacijentica s normalnim odgovorom nalazi veća koncentracija Asn/Ser varijante, koja je povezana s većom senzitivnošću na FSH i većim brojem folikula i oocita. Nasuprot tome, pacijentice sa slabim odgovorom jajnika češće imaju Ser/Ser varijantu genotipa, koja zahtijeva značajno veću dozu primijenjenih gonadotropina (217). U većini standardnih IVF protokola za pacijentice sa slabim ovarijskim odgovorom, uobičajena je doza gonadotropina od najmanje 300 IU/L dnevno. Iako su u pojedinim istraživanjima upotrebljavala doza iznad 450 IU/L kako bi se dobilo više jajnih stanica, pokazalo se da to ne dovodi do povećanja broja oocita (37,116). Danas je dokazano da je u ovoj skupini pacijentica manji broj folikula prikladan za sazrijevanje i rast, te da gonadotropini, neovisno o primijenjenoj dozi, potiču na rast samo kohortu folikula senzitivnu na stimulaciju. U sklopu multicentrične OPTIMIST studije, provedene na 1515 ispitanica, od kojih je njih 511 svrstano u grupu s predviđenim slabim odgovorom na stimulaciju ovulacije

prema nalazu broja antalnih folikula (AFC manji od 8), nije utvrđena statistički značajna razlika u broju živorođenih između pacijentica koje su primile dozu FSH od 150 IU/dan i pacijentica koje su primile dozu od 450 IU/dan (218). Iako je studija bila multicentrična, kasnije su se pojavile zabrinutosti drugih autora u vezi s interpretacijom podataka i načinom prikupljanja istraživačke populacije, što je dovelo u pitanje primjenu ovih preporuka u svakodnevnoj kliničkoj praksi (219–221). Nakon navedene studije, Lensen i suradnici publicirali su Cochranovu meta analizu također uspoređujući doze gonadotropina u pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom (222). Studija je uključivala pet randomizirana kontrolirana pokusa, a uspoređivane su 3 skupine; 150 IU naspram 300/450 IU, 300 IU naspram 400/450 IU, i 450 IU naspram 600 IU. Kao i u OPTIMIST studiji, nisu zabilježene statistički značajne razlike u broju postignutih trudnoća, međutim kod primjene doze veće od 150 IU zabilježen je veći broj oocita. U meta analizi objavljenoj 2021. nije dokazana statistički značajna razlika u broju postignutih trudnoća i broja živorođenih između blage i standardne stimulacije ovulacije (128). Boudry ipak naglašava kako još nema dovoljno dokaza za odabir optimalne vrste i doze gonadotropina. Odluka o vrsti upotrijebljenog gonadotropina, stoga je najčešće temeljena na iskustvu kliničara, dostupnosti i cijeni lijeka (223). Prema ESHRE smjernicama, ne postoji dovoljno dokaza kako bi se doze veće od 300 IU opravdale u svakodnevnom radu (77). Sukladno standardnoj kliničkoj praksi, u našem istraživanju koristili smo početnu dozu gonadotropina od 300 IU za pacijentice sa slabim odgovorom jajnika. Dok je u većine ispitanica ista doza primjenjivana tijekom cijelog postupka stimulacije ovulacije, u njih 4% u svakoj skupini doza je prilagođavana do 50 IU/L. Pacijentice u skupini fleksibilnog protokola značajno su duže stimulirane gonadotropinima (10.5 dana vs. 9.5 dana,  $P=0.001$ ). S obzirom na dužu primjenu gonadotropina, u ovoj skupini pacijentica i injekcija rekombinantnog hCG za završno sazrijevanje oocita primijenjena kasnije (11. dan stimulacije ovulacije naspram 12.5 dan stimulacije ovulacije,  $P<0.001$ ). Broj i veličina dobivenih folikula nisu se razlikovale u obje skupine. Analizom podskupina primijećena je statistički značajna razlika u trajanju primjene i ukupne doze korištenih gonadotropina. Statistički značajna razlika zabilježena je u skupini pacijentica s ostvarenom trudnoćom, neovisno o protokolu. Post hoc analizom statistički značajna razlika zabilježena je u podskupini fiksnog protokola bez ostvarene trudnoće i fleksibilnog protokola sa ostvarenom trudnoćom (11 naspram 13 dana). Dakle, u skupini pacijentica s postignutom trudnoćom, fleksibilni protokol je zahtijevao najdužu primjenu gonadotropina (medijan 13 dana). Dodatnom analizom podskupina pokazano je da je skupina pacijentica s fleksibilnim protokolom i postignutom trudnoćom najduže koristila GnRH antagonist (medijan 7 dana,  $P=0.001$ ).

Dob žene smatra se naj značajnim prediktorom postizanja trudnoće, kako u prirodnom menstrualnom ciklusu, tako i u postupcima medicinski potpomognute oplodnje (55,224–226). Starenjem jajnika, zbog kromosomskih abnormalnosti i disfunkcije mitohondrija dolazi do smanjenja kvalitete oocita (227,228). U žene starije dobi raste broj aneuploidnih embrija i nekvalitetnih blastocista koji nisu prikladni za embriotransfer (229). Nedavna retrospektivna studija Morin i suradnika pokazala je da, kada se usporede pacijentice s normalnim i slabim ovarijskim odgovorom iste dobi, postoji jednaka vjerojatnost razvoja kvalitetne blastociste i euploidnog embrija. Zaključeno je da jajne stanice žena s lošim odgovorom nisu lošije kvalitete u usporedbi s pacijenticama iste dobi s normalnim ovarijskim odgovorom (230). U suprotnosti s istraživanjem Lebovitz i suradnika, koje je pokazalo značajno veći broj živorođenih u skupini pacijentica mlađih od 40 godina (7% u usporedbi s 2% živorođenih) (231), naše istraživanje nije potvrdilo ove rezultate. Iako bez statistički značajne razlike između četiri promatrane skupine, najmlađe ispitanice (medijan 37 godina) zabilježene su u skupini fiksnog protokola bez ostvarene trudnoće. Osim toga, najviši prosjek godina (medijan 40 godina) zabilježen je u skupini fleksibilnog protokola s ostvarenom trudnoćom.

Broj oocita predstavlja drugi najznačajniji prediktorski faktor za postizanje trudnoće u postupcima medicinski potpomognute oplodnje. Istraživanja provedena na pacijenticama sa slabim odgovorom jajnika ukazuju na značajno veći broj oocita dobivenih u postupcima koji su rezultirali trudnoćom u usporedbi s onima koji nisu. U istraživanju Lebovitz i suradnika, jedini statistički značajan faktor povezan s postizanjem trudnoće, uz dob pacijentice, bio je prosječan broj sakupljenih oocita (OR 1,95; 95% CI 1,20–3,16; P = 0,007). Ova istraživanja podupiru prethodno poznate rezultate koji su pokazali pozitivnu korelaciju između broja dobivenih oocita i broja trudnoća u pacijentica sa slabim odgovorom jajnika (224,232).

U više istraživanja tijekom kojih se pratio broj i kvaliteta oocita uspoređujući 2 vrste antagonističkog protokola u pacijentica sa normalnim ovarijskim odgovorom statističke razlike nisu nađene (22,23,197–201). S obzirom da navedene studije nisu provedene u skupini pacijentica sa slabim odgovorom jajnika ne postoje ranije reference za ovu skupinu pacijentica. U našem istraživanju, nisu zabilježene statistički značajne razlike između dviju glavnih skupina po broju ukupno dobivenih oocita (prosijek 3.6 u fiksnom, naspram 3.2 u fleksibilnom protokolu), te broju oocita u metafazi II (2.7 MII oocite u fiksnom naspram 1.2 MII oocite u fleksibilnom protokolu). Međutim analizom varijance između broja zrelih oocita (MII) pronađena je statistički značajna razlika između skupina s ostvarenom trudnoćom (najveći broj oocita zabilježen je u fleksibilnom protokolu s ostvarenom trudnoćom, prosjek 4.2 oocite,

P=0.038) Broj dobivenih oocita u našem, ne razlikuje se značajno prema broju oocita dobivenih u drugim istraživanjima, u kojima se uspoređivao učinak GnRH agonističkog s fleksibilnim GnRH antagonističkim protokolom. U studiji Sunkara i suradnika, broj dobivenih oocita u fleksibilnom protokolu iznosio je  $3.30 \pm 2.91$  oocite (95).

Sve veća pažnja posvećuje se određivanju hormonskog profila tijekom stimulacije ovulacije. Istraživanja ukazuju na potencijalni utjecaj koncentracije estrogena na ishod postupka medicinski potpomognute oplodnje (27,233,234) što predstavlja novo područje vrijedno istraživanja (26,27). U studiji Lyttle Schumacher i suradnika, istražen je utjecaj koncentracije estradiola i veličine folikula na postotak ostvarenih trudnoća. Utvrđeno je da koncentracija estradiola ispod 300 pg/mL ili iznad 1100 pg/mL na dan primjene antagonista smanjuje šansu za trudnoću za 40% (OR 0,60, 95% CI 0,5-0,7). Započinjanje s antagonistom kod veličine folikula iznad 16 mm rezultiralo je smanjenjem broja trudnoća za 25% (OR 0,76, 95% CI 0.69, 0.84). Post hoc analizom, koncentracije estradiola mjerene na dan uvođenja antagonista podijeljene su u tri kategorije: E2 < 300 pg/mL, E2 300-1100 pg/mL i E2 > 1100 pg/mL. Utvrđeno je značajno manji broj dobivenih oocita kod koncentracija E2 < 300 pg/mL (8 prema 14) u usporedbi s pacijenticama s optimalnom koncentracijom E2 300-1100 pg/mL (P<0,001). Također, najveći broj oplođenih oocita bio je u skupini pacijentica s razinom estradiola od 300-1100 pg/mL. U navedenoj studiji, od svih parametara koji su praćeni pri uvođenju antagonista (dan ciklusa, veličina folikula i razina E2), najznačajnijim prediktorom postizanja trudnoće pokazala se razina estradiola. U skupini pacijentica s razinom estradiola iznad 1100 pg/mL, zabilježeno je najkraće vrijeme terapije GnRH antagonistima. Najviša stopa trudnoće zabilježena je kod E2 500-599 pg/mL, dok je najniža bila kod E2 < 300 pg/mL. Ako je primjena antagonista započela kod koncentracije estradiola niže od 300 pg/mL ili veće od 1100 pg/mL, stopa ostvarenih trudnoća bila je smanjena za 40% (25). Ovo istraživanje je obuhvatilo 34.862 ciklusa s GnRH antagonističkim protokolom, uključujući najveći broj pacijentica s normalnim odgovorom jajnika. S obzirom na raznolikost varijabli kao što su trajanje steriliteta, debljina endometrija na dan transfera i broj prenesenih embrija, postavlja se pitanje mogućnosti sistematske pogreške u interpretaciji rezultata (235). Jedna od mogućih objašnjenja utjecaja razine estradiola na ishod postupka, prema Al Innayu jest da smanjena koncentracija estradiola može utjecati na programiranje mitoze stanica uključenih u folikulogenezu (236). Drugo moguće objašnjenje stoji u činjenici da promijenjene koncentracije estradiola smanjuju receptivnost endometrija i implantaciju (207). U studiji Wang i suradnika objavljenoj 2022., prvi puta je dokazana jasna nelinearna povezanost između razine



estradiola na dan započinjanja GnRH antagonista i broja kliničkih trudnoća u ciklusima sa svježim embriotransferom (235). Najveći broj trudnoća zabilježen je kod razine estradiola od 498 pg/mL. Ukoliko je antagonist uveden kod koncentracija manjih od 498 pg/mL, broj trudnoća je bio za 5% veći za svakih 100 pg/mL porasta E2. Kod koncentracija iznad 498 pg/mL broj trudnoća se smanjio za 3% sa svakih 100 pg/mL povećanja E2. Kod razine iznad 894.4 pg/mL, broj trudnoća smanjen je čak za 40%.

Prema dvostaničnoj dvogonadotropinskoj teoriji (*engl. „two-cell, two-gonadotropin theory“*), teka stanice posjeduju enzim P450c17, potreban za sintezu androgena. U granulosa stanicama taj enzim nedostaje, stoga su one ovisne o sintetiziranim androgenima iz teka stanica. Aromatizacijom androgena u granulosa stanicama nastaje estradiol. Supresija endogenog LH GnRH antagonistima, dovodi do smanjenje aktivnosti teka stanica, a time i smanjenog stvaranja androgenih supstrata te posljedično i estradiola. Zapčinjanje GnRH antagonista rano u ciklusu, kada je razina E2 niska, moglo bi dovesti do smanjenog stvaranja estradiola za vrijeme stimulacije ovulacije (235). Jedna randomizirana kontrolirana studija potvrdila je ovu teoriju bilježeći razine estradiola slične onima u prirodnom ciklusu kada je antagonist uveden drugi dan ciklusa u odnosu na 6. dan stimuliranog ciklusa (237).

Za očekivati je da su u skupini pacijentica sa smanjenim ovarijskim odgovorom zbog manjeg broja folikula i razine estradiola niže.

U našem istraživanju nisu zabilježene statističke značajne razlike u razini estradiola mjerenih 2. dan stimuliranog ciklusa, kao ni na dan uvođenja GnRH antagonista i na dan primjene rekombinantnog hCG-a između glavnih skupina. Iako se zamjećuju više koncentracije estradiola mjerenih na dan uvođenja antagonista i na dan primjene hCG-a u skupini s fleksibilnim protokolom (1977.2 pmol/L u odnosu na 1707.9 pmol/L na dan uvođenja antagonista te 3697.2 pmol/L prema 3556.6 pmol/L na dan primjene rekombinantnog hCG-a), razlika nije statistički značajna. Analizom podskupina zabilježena je statistički značajna razlika estradiola mjerenog na dan primjene rekombinantnog hCG-a između skupina fiksnog protokola bez ostvarene trudnoće i fleksibilnog protokola s ostvarenom trudnoćom ( $P=0.03$ ). Najviše razine estradiola zabilježene su u skupini pacijentica s fleksibilnim protokolom i ostvarenom trudnoćom (prosjeak 5817.1 pmol/L), zatim u skupini s fiksnim protokolom i ostvarenom trudnoćom (prosjeak 4632.5 pmol/L). Također više razine estradiola mjerene na dan uvođenja antagonista zabilježene su u fleksibilnom protokolu s ostvarenom trudnoćom (3010.5 pmol/L). Najniža razina estradiola na dan uvođenja antagonista zabilježena je u podskupini pacijentica s fiksnim protokolom s ostvarenom trudnoćom (prosjeak 1561.6 pmol/L). Ukoliko ove vrijednosti

izrazimo u standardnim jedinicama pg/mL, zamjećujemo da je u skupini pacijentica s fleksibilnim protokolom i ostvarenom trudnoćom vrijednost estradiola na dan uvođenja antagonista iznosila prosječno 820 pg/mL, odnosno 425 pg/mL u skupini pacijentica s fiksnim protokolom i ostvarenom trudnoćom što je u skladu s provedenim istraživanjima u skupini pacijentica s normalnim ovarijskim odgovorom (25).

Učinak progesterona na ishod postupka u određivanog u različitim fazama stimuliranog ciklusa već je duže vrijeme predmet istraživanja. U menstrualnom ciklusu, do implantacije dolazi 6. dan nakon oplodnje. Tijekom lutealne faze u žutom tijelu dolazi do morfoloških i biokemijskih promjena koje nazivamo luteinizacija. Najveći utjecaj na luteinizaciju ima LH, koji potiče granulosa stanice na sekreciju progesterona. Progesteron djeluje na endometriju uzrokujući njegovu sekretornu transformaciju čime ga priprema za implantaciju (204). Tijekom ovarijske stimulacije fiziologija sekrecije progesterona je promijenjena. Egzogen primjena gonadotropina dovodi do porasta progesterona ranije u ciklusu, već tijekom folikularne faze. Rast razine progesterona za vrijeme kasne folikularne faze može se pripisati pojačanom odgovoru granulosa stanica prisutnih u multiplim folikulima na LH što se naziva prijevremenom luteinizacijom (238). Kako je ranije naglašeno, GnRH analozi, agonisti i antagonisti, uzrokujući „down regulaciju“ receptora hipofize, koriste se kako bi se spriječila ova pojava (239–241). Međutim, rast koncentracije progesterona tijekom folikularne faze nije uvijek u potpunosti eliminirana GnRH analogima (242,243). Zbog različitog patofiziološkog mehanizma nastanka ove dvije pojave, Adda-Herzog i suradnici predlažu preimenovanje fenomena porasta progesterona zamijećenog u folikularnoj fazi stimuliranog ciklusa u prijevremeni porast progesterona, umjesto termina prijevremene luteinizacije (244). Ipak u raznim studijama porast progesterona u folikularnoj fazi i dalje se naziva prijevremenom luteinizacijom, zbog čega je pretraživanje literature otežano (245). Prema dosada poznatim podacima, prijevremeni porast progesterona javlja se u 5-38% postupaka stimulacije ovulacije (246–248). Najvjerojatnija teorija nastanka ove pojave povezana je s brojem folikula. Svaki folikul izlučuje malu količinu progesterona, pa veći broj folikula rezultira povećanom razinom progesterona, što su i pokazala istraživanja (246,249,250). Visoke doze primijenjenih gonadotropina povećavaju rizik od prijevremenog porasta progesterona (245,247,251), dok dodatak LH smanjuje ovaj rizik (252). Naime, luteinizirajući hormon dovodi do "up-regulacije" enzima 17-hidroksilaze prisutnog u teka stanicama koji potiče konverziju progesterona u androgene. Androgeni se potom aromatizacijom pretvaraju u estrogene (252). Ove činjenice podržavaju prethodno spomenutu teoriju da prijevremeni porast progesterona u standardnom

IVF postupku nije rezultat LH-inducirane luteinizacije, već proizvodnje progesterona potaknute velikim brojem folikula. Prema istraživanjima Venetisa i Boscha, broj oocita čini se najvažnijim faktorom u predviđanju povećanja razine progesterona iznad 1.5 ng/mL i postizanju trudnoće (246,253). Papaleo i suradnici potvrdili su da i drugi poznati čimbenici, poput ukupne doze primijenjenog FSH, koncentracije estradiola u vrijeme aplikacije hCG-a i visoke vrijednosti progesterona na početku stimulacije (0.45ng/mL), čine značajan rizični faktor za pojavu prijevremenog rasta progesterona u kasnoj folikularnoj fazi (254). Tijekom proteklih godina predložene granične vrijednosti progesterona na dan primjene hCG-a kreću se od 0.8 do 3 ng/mL (2.5- 9.5 nmol/L). Prema meta analizi, vrijednosti već iznad 0.8 ng/mL (2.5 nmol/L) povezane su sa značajnom redukcijom stopa trudnoće (255). Danas najčešće upotrebljavana granična vrijednosti iznosi 1.5 ng/mL (4.7nmol/L) i ova se vrijednost čini krucijalnom u promjeni genske ekspresije endometrija (110,256). Stoga, u slučajevima kada je koncentracija progesterona iznad 1.5 ng/mL na dan primjene hCG-a, embriotransfer se često odgađa, uglavnom radi smanjenja rizika od neuspješne implantacije.

U našem istraživanju, embriotransfer nije odgođen ni jedne ispitanice zbog povišene razine progesterona iznad navedene granice. Najniže koncentracije progesterona bilježe se za vrijeme menstruacije zbog regresije žutog tijela. U slučaju nepotpune luteolize, koncentracija progesterona može ostati povišena čak i u ranim fazama novog menstrualnog ciklusa. Bazalne koncentracije progesterona, koje se mjere tijekom prvih 3 dana stimulacije, pokazale su se kao najvažniji faktor u predviđanju porasta progesterona na dan primjene hCG-a (257). Ostali parametri poput LH, FSH, AMH, E2 i AFC imali su manji utjecaj (254). Povišene bazalne razine progesterona zabilježene su i u GnRH agonističkim (258,259) i GnRH antagonističkim protokolima (260–262). Učestalost povišene koncentracije progesterona drugog dana stimulacije u GnRH antagonističkom protokolu varira od 4.9% do 13.3% stimuliranih ciklusa (260–262). Odgoda primjene gonadotropina mogla bi dovesti do normalizacije vrijednosti progesterona. Kolibianakis i suradnici prvi su uspjeli dokazati negativan utjecaj povišenih bazalnih vrijednosti progesterona na postizanje trudnoće (262). Ova studija je pokazala da koncentracije progesterona iznad 1.6 ng/mL (5.08 nmol/L) mjenjenog drugog dana stimuliranog ciklusa može smanjiti šanse za postizanje trudnoće kod pacijentica koje se liječe rekombinantnim FSH-om i GnRH antagonistima. Slične rezultate su zabilježili i Hamdine i suradnici (261) zaključujući da postoji negativan učinak na postizanje trudnoće kod koncentracija progesterona iznad 1.5 ng/mL (4.77 nmol/L). Iako su provedena razna istraživanja, jedinstvena vrijednost progesterona kod koje je uspješnost postupka snižena nije

pronađena. U studiji Mutlu i suradnica, utvrđena je učestalija pojava vrijednosti progesterona iznad 1.5 ng/mL, mjerenog na dan primjene hCG-a, kada je koncentracija progesterona drugog dana ciklusa bila iznad 0.65 ng/mL (263). S druge strane, Faulisi i suradnici nisu dokazali kliničku značajnost bazalno povišenog progesterona (264). Tang i suradnici mjerili su koncentracije progesterona 4. dana stimulacije i utvrdili da su vrijednosti iznad 3 ng/mL bile povezane sa značajnim smanjenjem broja trudnoća (259). Studije Santos-Riberro i suradnika te Arvis i suradnika, potvrdile su smanjen postotak trudnoća kod vrijednosti progesterona, mjerenih na dan injekcije hCG iznad 1.5 ng/mL ( 4,7 nmol/L) (265,266).

Navedena istraživanja uglavnom se odnose na općenitu skupinu pacijentica liječenih postupcima medicinski potpomognute oplodnje te kako smo do sada vidjeli ni u njih granične vrijednosti, kako bazalnog tako ni progesterona na dan injekcije hCG-a, nisu etablirane. Istraživanja koja bi se odnosila na pacijentice sa slabim ovarijskim odgovorom još su rjeđa pa je time interpretacija rezultata otežana.

U našem istraživanju, ni kod jedne od 100 promatranih ispitanica, vrijednosti bazalnog progesterona nisu iznosile iznad 2.9 nmol/L. Srednje vrijednosti progesterona drugog dana stimulacije iznosile su 1.2 nmol/L u fiksnom protokolu i 1.5 nmol/L u fleksibilnom protokolu, što je bez statistički značajne razlike. Primijećene su statistički značajne razlike u kretanju progesterona između različitih faza fiksnog i fleksibilnog protokola, sa statistički značajno višim koncentracijama progesterona u fleksibilnom u odnosu na fiksni protokol (prosječno 3.0 nmol/L nasuprot 1.8 nmol/L). Iako se u objavljenim studijama povišene razine progesterona na dan primjene hCG-a javljaju u 5-38% stimulacija (246–248), u našem istraživanju vrijednost progesterona iznad 4.7 nmol/L zabilježena je u 8 ispitanica (8%). Od toga dvije povišene vrijednosti zabilježene su u fiksnom protokolu – 1% (dobivene 0 i 3 MII oocite, bez oplodnje), naspram ostalih 6 zabilježeno u fleksibilnom protokolu – 4% (dobiveno 1 MII oocita- bez oplodnje, 1 MII oocita – bez oplodnje. O MII oocita, 5 MII oocita -3 embrija, O MII oocite, 4 MII oocite – 3 embrija). Post- hoc analizom nađena je stvarna razlika između skupina fiksnog i fleksibilnog protokola s ostvarenom trudnoćom ( $P=0.032$ ), pri čemu je izmjerena viša razina progesterona u skupini fleksibilnog u odnosu na fiksni protokol (medijan 1.6 nmol/L u odnosu na medijan 0.75 nmol/L). Iz navedenog možemo zaključiti da postoji i granična vrijednost ispod koje je trudnoća manje vjerojatna, u našem slučaju ta vrijednost za pacijentice sa slabim ovarijskim odgovorom iznosi 1.6 nmol/L.

Prema teoriji kojom veći broj folikula dovodi do povećanja razine progesterona, bilo bi logično zaključiti da pacijentice sa smanjenom ovarijskom rezervom, zbog manjeg broja

folikula i oocita, nemaju opasnost od prekomjernog lučenja progesterona. Međutim, u našem istraživanju pokazali smo da su najviše koncentracije progesterona na dan primjene rekombinantnog hCG-a izmjerene kod ispitanica kod kojih je broj oocita bio jedan ili nula (5 od 8 ispitanica). Postoji nekoliko objašnjenja koja bi mogla objasniti ovaj fenomen. Studija Beckers i suradnika ističe mogućnost pojave viših vrijednosti progesterona u prirodnom ciklusu kod žena s smanjenom ovarijskom rezervom, što je uzrokovano kontinuiranom sekrecijom progesterona iz žutog tijela (267). Drugo objašnjenje može biti tendencija davanja većih doza gonadotropina tijekom stimulacije u ovoj skupini pacijentica. Određeni istraživači naglašavaju važnost uzimanja u obzir jačine odgovora jajnika pri tumačenju povišenih vrijednosti progesterona (268). U studiji Adda-Herzog i suradnika autori su naglasili da se broj kliničkih trudnoća ne razlikuje u grupi pacijentica sa jakim (30% prema 34%) i normalnim (31% prema 30%) odgovorom stimulacije ovulacije, dok je u pacijentica sa smanjenim ovarijskim odgovorom progesteron iznad 0.9 ng/mL (2.8 nmol/L) rezultirao smanjenim postotkom trudnoća (3.2% naspram 23%) (244). Ovo se može objasniti činjenicom da embriji slabije kvalitete u ovih pacijentica nisu dovoljni da kompenziraju promijene receptivnosti endometrija uzrokovane višim razinama progesterona. S druge strane, u retrospektivnoj opservacijskoj studiji koja je analizirala 5447 IVF ciklusa, zaključeno je da se kod pacijentica s lošim odgovorom jajnika povišene razine progesterona na dan primjene humanog korionskog gonadotropina mogu zanemariti kako bi se izbjegla nepotrebna otkazivanja ili zamrzavanje embrija. Ova studija pokazala je da kod pacijentica sa slabim odgovorom jajnika, koje su imale tri ili manje oocita, utjecaj povišenog progesterona na ishod postupka ostaje minimalan, za razliku od vrlo niskih vrijednosti progesterona, posebno ispod 0,5 ng/mL, kada se postotak živorođene djece značajno smanjuje (266). Ovo zapažanje u skladu je s drugim studijama koje su također pokazale da je krioprezervacija embrija korisna kod pacijentica s prenatlaženim odgovorom jajnika, ali ne i kod pacijentica s lošim odgovorom jajnika (269). Prema istraživanju Xu i suradnika, u skupini pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom, granična vrijednost progesterona na početku ciklusa kod koje je ishod postupka lošiji iznosi 1,5 ng/mL (4,77 nmol/L). U pacijentica s normalnim ovarijskim odgovorom ta vrijednost je iznad 1,75 ng/mL, dok je u pacijentica s prenatlaženim odgovorom jajnika granična vrijednost 2,25 ng/mL (268). Ipak, jasno značenje povišenih razina progesterona na početku i u kasnoj folikularnoj fazi ciklusa na ishode postupka u pacijentica sa slabim odgovorom jajnika još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Smjernice Europskog društva za humanu reprodukciju i embriologiju (ESHRE) ne preporučuju rutinsko određivanje razine progesterona na početku ciklusa kod pacijentica starijih od 39 godina. (77).

U našem istraživanju pokušali smo, primjenom regresijskih modela, odgovoriti na pitanje postoji li, ovisno o vrsti GnRH antagonističkog protokola, utjecaj koncentracija LH, E2, P4 na dan uvođenja antagonista, na ishod postupka stimulacije ovulacije. Uočena je statistička značajnost prediktornog modela ( $P < 0.001$ ), ali s slabim efektom skupa prediktora na broj dobivenih MII oocita ( $R^2 = 0.179$ ), što bi značilo da se 17.9% varijance broja MII oocita može objasniti ovim skupom prediktora. U skladu s time, rezultati ovog istraživanja ukazuju da vrsta korištenog GnRH antagonističkog protokola, te hormoni E2, LH, P4 na dan uvođenja antagonista imaju slab efekt na broj dobivenih MII oocita ( $P < 0.001$ ).

Iako je glavni cilj svakog kliničara postizanje trudnoće primjenom najoptimalnijeg protokola s najvećom vjerojatnosti uspjeha za svaki pojedini par, danas je važno uzeti u obzir i isplativost postupka (*engl. cost effectiveness*). Rezultati istraživanja nisu jednoznačni, i dok su pojedine studije pokazale manju količinu ukupno primijenjenih lijekova, kako gonadotropina tako i GnRH antagonista u fleksibilnom antagonističkom protokolu (201,202,214,215), druge studije nisu to potvrdile, te je zabilježena veća doza primijenjenih lijekova u fleksibilnom protokolu (23). S obzirom da su u navedena istraživanja uključene pacijentice s normalnim ili prenaplašenim ovarijskim odgovorom, u našem istraživanju proveli smo analizu na skupini pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom. Naši rezultati ukazuju da je u fiksnom protokolu zabilježena značajno duža primjena antagonista u odnosu na fleksibilni protokol (5 u odnosu na 4 dana,  $P=0.02$ ). Ispitanice koje su bile u fleksibilnom protokolu bile su duže stimulirane gonadotropinima (medijan 10.5 dana u fleksibilnom protokolu u odnosu na 9.5 dana u fiksnom protokolu) i primile su ukupno veću dozu gonadotropina s medijanom od 2812.5 I.J, u usporedbi s 2475 I.J. u fiksnom protokolu ( $P=0.009$ ). Analizom podskupina zabilježena je najduža primjena GnRH antagonista u trajanju od medijan 7 dana u skupini fleksibilnim protokolom i ostvarenom trudnoćom. U oba protokola s ostvarenom trudnoćom gonadotropini su duže primjenjivani.

Nacionalni institut za zdravlje i njegu Velike Britanije (*engl. National Institute for Health and Care Excellence - NICE*) preporučuje definiranje odustajanja od IVF ciklusa kao ciklusa u kojem, zbog izostanka folikulogeneze, nije proveden postupak sakupljanja jajnih stanica (270). Međutim, u raznim studijama pod tim se terminom često uključuju i postupci otkazani zbog negativne aspiracije, izostanka oplodnje ili zastoja u razvoju embrija (271). U pacijentica sa slabim odgovorom na ovarijsku stimulaciju, primijećen je veći postotak otkazanih ciklusa u usporedbi s pacijenticama sa normalnim ovarijskim odgovorom (272,273). U studiji Lamazou i suradnika, postotak otkazanih postupaka bio je 37,8% u pacijentica sa

slabim ovarijskim odgovorom, u usporedbi s 13,3% u pacijentica s normalnim ovarijskim odgovorom (274). U istraživanju koje je obuhvatilo 134 ispitanice, od kojih je u 77 primijenjen kratki GnRH agonistički protokol, a u 57 GnRH antagonistički protokol, nije zabilježeno nijedno otkazivanje ciklusa u antagonističkom protokolu, dok je u agonističkom protokolu zabilježeno 4 otkazivanja, što odgovara 7% ispitanica (272). U pacijentica starijih od 40 godina, broj otkazanih ciklusa je i veći. U studiji Sugimoto i suradnika, od 364 stimulirana ciklusa s GnRH agonistima ili antagonistima, 42 ciklusa (11,5%) otkazana su zbog nedostatka razvoja folikula, dok je 120 ciklusa (33%) otkazano zbog negativne aspiracije, nedostatka oplodnje ili loše kvalitete embrija (271).

U našem istraživanju, od ukupnog broja od 50 ispitanica u kojih je primijenjen fiksni GnRH antagonistički protokol, otkazan je jedan postupak zbog izostanka razvoja folikula, što čini 1% u ukupnom uzorku. U fleksibilnom protokolu ni jedan postupak nije otkazan zbog izostanka razvoja folikula. U skupini pacijentica s fiksnim protokolom, zabilježeno je pet slučajeva negativne aspiracije u usporedbi s četiri slučaja u skupini s fleksibilnim protokolom. Odustajanje od embriotransfera zbog nedostatka oplodnje nakon IVF/ICSI postupka ili zastoja u razvoju embrija zabilježeno je kod četrnaest ispitanica. Dakle, u našem istraživanju, postotak otkazivanja stimuliranog ciklusa zbog izostanka odgovora jajnika na primijenjenu terapiju iznosi 1%, dok se od postupka zbog negativne aspiracije, nedostatka oplodnje ili neadekvatnih embrija odustalo u 25% pacijentica (24% u fiksnom protokolu, 26% u fleksibilnom protokolu).

## 7. ZAKLJUČAK

Pacijentice sa slabim odgovorom jajnika na stimulaciju ovulacije čine otprilike 20% svih pacijentica koje se podvrgavaju metodama medicinski potpomognute oplodnje. U usporedbi s pacijenticama s normalnim odgovorom jajnika, ova skupina ima niži postotak uspješnosti IVF postupka. Iako su istražene različite metode liječenja i protokoli stimulacije ovulacije, do danas nije zabilježeno značajno poboljšanje u broju ostvarenih trudnoća.

U našem istraživanju, u skladu s rezultatima drugih studija, postotak uspješnosti stimulacije ovulacije iznosio je 14%. Vrijeme primjene antagonista nije pokazalo statistički značajnu povezanost s postizanjem trudnoće u ovoj skupini pacijentica. Ipak, primijetili smo veći broj dobivenih oocita u protokolu s fleksibilnim uvođenjem antagonista. U skupini pacijentica s ostvarenom trudnoćom, najveći broj oocita zabilježen je u fleksibilnom protokolu. U ovoj skupini pacijentica primjena gonadotropina trajala je najduže, a početak primjene antagonista bio je najkasniji. To nas upućuje na zaključak da je u pacijentica s lošim odgovorom jajnika, najvjerojatnije zbog smanjenog odgovora jajnika na egzogeni FSH, potrebna duža primjena gonadotropina.

Također, u skupini s fleksibilnim protokolom, primijetili smo značajno manju upotrebu lijekova, gonadotropina i antagonista. Iako ta razlika nije tako izražena kao u postupcima kod žena s normalnim odgovorom jajnika, ona se može objasniti većom ukupnom potrebom doze primijenjenih gonadotropina i duljom stimulacijom nego u skupinama pacijentica s normalnim ili prenatlaženim odgovorom.

Individualizacijom primjene lijekova, broj odustajanja bio je manji, a u skupini pacijentica s fleksibilnim protokolom nije zabilježen nijedan slučaj odustajanja zbog izostanka razvoja folikula, dok je u skupini s fiksnim protokolom postotak odustajanja iznosio 2%.

Primijećena je statistički značajna razlika u razini progesterona između različitih faza fiksnog i fleksibilnog protokola, sa statistički značajno višim koncentracijama progesterona u fleksibilnom u odnosu na fiksni protokol. Post-hoc analizom nađena je stvarna razlika između skupina fiksnog i fleksibilnog protokola s ostvarenom trudnoćom, pri čemu je izmjerena viša razina progesterona u skupini fleksibilnog u odnosu na fiksni protokol. Iz navedenog možemo zaključiti da postoji i granična vrijednost ispod koje je trudnoća manje vjerojatna, u našem slučaju ta vrijednost za pacijentice sa slabim ovarijskim odgovorom iznosi 1.6 nmol/L.



Uočena je statistička značajnost prediktornog modela koncentracija LH, E2, P4 na dan uvođenja antagonista na ishod postupka stimulacije ovulacije, ali sa slabim efektom skupa prediktora na broj dobivenih MII oocita. U skladu s time, rezultati ovog istraživanja ukazuju da vrsta korištenog GnRH antagonističkog protokola, te hormoni E2, LH, P4 na dan uvođenja antagonista imaju slab efekt na broj dobivenih MII oocita.

Rezultati našeg istraživanja daju značajan doprinos u odabiru optimalnog protokola stimulacije ovulacije za pacijentice sa slabim ovarijskim odgovorom. Ovi rezultati potvrđuju opravdanost mjerenja serumske razine navedenih hormona u folikularnoj fazi ciklusa u skupini pacijentica sa slabim ovarijskim odgovorom s ciljem poboljšanja ishoda postupka, smanjenja količine upotrebljenih lijekova te smanjenje odustajanja.

## 8. SAŽETAK

Pacijentice sa slabim odgovorom jajnika na stimulaciju ovulacije predstavljaju poseban izazov u postupcima in vitro oplodnje jer je njihov uspjeh značajno smanjen. S obzirom na sve veću želju za reprodukcijom u kasnijoj dobi, broj žena sa slabim ovarijskim odgovorom raste. U skupini ovih pacijentica korišteni su razni protokoli stimulacije ovulacije s ciljem poboljšanja ishoda IVF postupka, ali ni jedan se nije pokazao superiornim u odnosu na druge. Najčešće su korišteni standardni protokoli stimulacije s GnRH agonistima ili GnRH antagonistima. Trenutno ne postoji objavljeno randomizirano kliničko istraživanje koje uspoređuje ishode IVF postupka kod primjene fiksnog i fleksibilnog GnRH antagonističkog protokola. U našem istraživanju pretpostavili smo da vrijeme primjene GnRH antagonista ima utjecaj na ishod IVF postupka, te da će uvođenjem GnRH antagonista u terapiju u pravo vrijeme doći do poboljšanja ishoda postupka te smanjenja odustajanja i količine potrošenih lijekova. Istražili smo kako koncentracija LH, E2 i P4 mjerenih u folikularnoj fazi ciklusa utječe na broj i kvalitetu jajnih stanica te na ishod postupka. U istraživanju je sudjelovalo 100 ispitanica, randomizirane u skupinu kojoj je primijenjen fiksni ili fleksibilni GnRH antagonistički protokol. Vrijeme primjene antagonista nije pokazalo statistički značajnu povezanost s postizanjem trudnoće u ovoj skupini pacijentica. Primijetili smo veći broj dobivenih oocita u protokolu s fleksibilnim uvođenjem antagonista. U skupini pacijentica s ostvarenom trudnoćom, najveći broj oocita zabilježen je u fleksibilnom protokolu. U ovoj skupini pacijentica primjena gonadotropina trajala je najduže, a početak primjene antagonista bio je najkasniji. U skupini s fleksibilnim protokolom primijetili smo značajno manju količinu potrošenih lijekova. Ovim istraživanjem pokazali smo da odabir optimalnog protokola stimulacije ovulacije u pacijentica s niskim odgovorom jajnika smanjuje broj odustajanja i količinu lijekova. Uočena je statistička značajnost prediktivnog modela koncentracija LH, E2, P4 na dan uvođenja antagonista na ishod postupka stimulacije ovulacije, ali s slabim efektom skupa prediktora na broj dobivenih MII oocita.

**KLJUČNE RIJEČI:** slab ovarijski odgovor na stimulaciju ovulacije, GnRH antagonistički protokol, IVF, stimulacija ovulacije

## 9. SUMMARY

### **The comparison of fixed and flexible antagonist protocol and IVF outcome in poor responders**

Iva Pitner, 2023.

Patients with poor ovarian response to ovarian stimulation are a special challenge for in vitro fertilization procedures, as their success rates are significantly reduced. Various protocols for ovarian stimulation have been tested in this group of patients in order to improve treatment outcomes, but none have shown superiority over the others. Currently, there is no published randomized clinical trial comparing the outcomes of IVF procedures using a fixed versus flexible GnRH antagonist protocol. In our study, we hypothesized that the timing of GnRH antagonist administration would impact the outcome of IVF procedures, and that introducing GnRH antagonists at the specific time would lead to improved treatment outcomes, reduced cancellation rates and decreased medication consumption. We investigated how the concentrations of LH, E2, and P4 measured in the follicular phase of the stimulated cycle affect the number and quality of oocytes, as well as the treatment outcome. The study included 100 participants randomized into a group receiving either a fixed or flexible GnRH antagonist protocol. The timing of antagonist administration did not show a statistically significant association with achieving pregnancy in this group of patients. We observed a higher number of retrieved oocytes in the protocol with flexible antagonist introduction. Among the patients who achieved pregnancy, the highest number of oocytes was recorded in the flexible protocol. In this group, the administration of gonadotropins lasted the longest, and the initiation of antagonist administration was the latest. This study demonstrated that selecting an optimal stimulation protocol in patients with poor ovarian response reduces cancellation rate and medication consumption. We observed statistical significance in the predictive model of LH, E2, and P4 concentrations on the day of antagonist administration regarding the outcome of ovulation stimulation procedures, although with a weak effect of the predictor set on the number of obtained MII oocytes.

**KEY WORDS:** poor responder, GnRH antagonist, IVF, ovarian stimulation

## 10. LITERAURA

1. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2020 Mar;113(3):533–5.
2. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R i sur. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril*. 2017 Sep;108(3):393–406.
3. Cox CM, Thoma ME, Tchangalova N, Mburu G, Bornstein MJ, Johnson CL i sur. Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Open* [Internet]. 2022 Sep 10 [pristupljeno 15.6.2023 ];2022(4). Dostupno na: <https://dx.doi.org/10.1093/hropen/hoac051>
4. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med*. 2012 Dec 18;9(12):e1001356.
5. Recent advances in medically assisted conception. Report of a WHO Scientific Group. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1992;820:1–111.
6. Sharara FI, Scott RT, Seifer DB. The detection of diminished ovarian reserve in infertile women. *Am J Obstet Gynecol*. 1998 Sep;179(3 Pt 1):804–12.
7. National Summary Report 2014. ART Report. Division of Reproductive Health. CDC [Internet]. [pristupljeno 16.06.2023.]. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/art/reports/2014/national-summary.html>
8. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L i sur. ESHRE consensus on the definition of ‘poor response’ to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011 Jul;26(7):1616–24.
9. Ferraretti AP, Gianaroli L. The Bologna criteria for the definition of poor ovarian responders: is there a need for revision? *Hum Reprod Oxf Engl*. 2014 Sep;29(9):1842–5.

10. Sills ES, Alper MM, Walsh APH. Ovarian reserve screening in infertility: practical applications and theoretical directions for research. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 Sep;146(1):30–6.
11. Nelson LM. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med.* 2009 Feb 5;360(6):606–14.
12. Fauser BCJM, Devroey P, Macklon NS. Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. *Lancet Lond Engl.* 2005 May 21;365(9473):1807–16.
13. Tarlatzis BC, Fauser BC, Kolibianakis EM, Diedrich K, Rombauts L, Devroey P. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update.* 2006;12(4):333–40.
14. Al-Inany HG, Youssef MA, Ayeleke RO, Brown J, Lam WS, Broekmans FJ. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Apr 29;4(4):CD001750.
15. Kyrou D, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Bontis J, Tarlatzis BC. How to improve the probability of pregnancy in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2009 Mar;91(3):749–66.
16. Griesinger G, Diedrich K, Tarlatzis BC, Kolibianakis EM. GnRH-antagonists in ovarian stimulation for IVF in patients with poor response to gonadotrophins, polycystic ovary syndrome, and risk of ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2006 Nov;13(5):628–38.
17. Pu D, Wu J, Liu J. Comparisons of GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol in poor ovarian responders undergoing IVF. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2011 Oct;26(10):2742–9.
18. Akman MA, Erden HF, Tosun SB, Bayazit N, Aksoy E, Bahceci M. Addition of GnRH antagonist in cycles of poor responders undergoing IVF. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2000 Oct;15(10):2145–7.
19. Cheung LP, Lam PM, Lok IH, Chiu TTY, Yeung SY, Tjer CC i sur. GnRH antagonist versus long GnRH agonist protocol in poor responders undergoing IVF: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2005 Mar 1;20(3):616–21.

20. Şahin S, Selçuk S, Devranoğlu B, Kutlu T, Kuyucu M, Eroğlu M. Comparison of long GnRH agonist versus GnRH antagonist protocol in poor responders. *Turk J Obstet Gynecol.* 2014 Dec;11(4):203–6.
21. Al-Inany HG, Youssef MA, Aboulghar M, Broekmans F, Sterrenburg M, Smit J i sur. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011 May 11;(5):CD001750.
22. Ludwig M, Katalinic A, Banz C, Schröder AK, Löning M, Weiss JM i sur. Tailoring the GnRH antagonist cetrorelix acetate to individual patients' needs in ovarian stimulation for IVF: results of a prospective, randomized study. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2002 Nov;17(11):2842–5.
23. Kolibianakis EM, Venetis CA, Kalogeropoulou L, Papanikolaou E, Tarlatzis BC. Fixed versus flexible gonadotropin-releasing hormone antagonist administration in in vitro fertilization: a randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2011 Feb;95(2):558–62.
24. Dayal MB, Frankfurter D, O'Hern C, Peak D, Dubey A, Gindoff PR. The use of lead follicle diameter to initiate gonadotropin-releasing hormone antagonist does not affect in vitro fertilization clinical pregnancy, implantation, or live birth rates: a prospective, randomized study. *Fertil Steril.* 2009 Dec;92(6):2047–9.
25. Lyttle Schumacher BM, Mersereau JE, Steiner AZ. Cycle day, estrogen level, and lead follicle size: analysis of 27,790 in vitro fertilization cycles to determine optimal start criteria for gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Fertil Steril.* 2018 Apr;109(4):633–7.
26. Chen Y, Ye B, Yang X, Zheng J, Lin J, Zhao J. Predicting the outcome of different protocols of in vitro fertilization with anti-Muüllerian hormone levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J Int Med Res.* 2017 Jun;45(3):1138–47.
27. Pereira N, Elias RT, Christos PJ, Petrini AC, Hancock K, Lekovich JP i sur. Supraphysiologic estradiol is an independent predictor of low birth weight in full-term singletons born after fresh embryo transfer. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2017 Jul 1;32(7):1410–7.
28. Blumenfeld Z. Premature ovarian failure: etiology and possible prevention. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2009 Mar;4(2):173–81.

29. Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev.* 1997 Feb;18(1):107–34.
30. Blumenfeld Z, von Wolff M. GnRH-analogues and oral contraceptives for fertility preservation in women during chemotherapy. *Hum Reprod Update.* 2008;14(6):543–52.
31. Skillern A, Rajkovic A. Recent developments in identifying genetic determinants of premature ovarian failure. *Sex Dev Genet Mol Biol Evol Endocrinol Embryol Pathol Sex Determ Differ.* 2008;2(4–5):228–43.
32. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update.* 2005;11(4):391–410.
33. Simpson JL. Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: overview of selected candidate genes. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1135:146–54.
34. Krauss CM, Turksoy RN, Atkins L, McLaughlin C, Brown LG, Page DC. Familial premature ovarian failure due to an interstitial deletion of the long arm of the X chromosome. *N Engl J Med.* 1987 Jul 16;317(3):125–31.
35. Chen YT, Mattison DR, Feigenbaum L, Fukui H, Schulman JD. Reduction in oocyte number following prenatal exposure to a diet high in galactose. *Science.* 1981 Dec 4;214(4525):1145–7.
36. Forges T, Monnier-Barbarino P, Leheup B, Jouvett P. Pathophysiology of impaired ovarian function in galactosaemia. *Hum Reprod Update.* 2006;12(5):573–84.
37. Berkkanoglu M, Ozgur K. What is the optimum maximal gonadotropin dosage used in microdose flare-up cycles in poor responders? *Fertil Steril.* 2010 Jul;94(2):662–5.
38. Toner JP, Philput CB, Jones GS, Muasher SJ. Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertil Steril.* 1991 Apr;55(4):784–91.
39. Scott RT, Hofmann GE. Prognostic assessment of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 1995 Jan;63(1):1–11.

40. Bukman A, Heineman MJ. Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Hum Reprod Update*. 2001;7(6):581–90.
41. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6):685–718.
42. Roberts JE, Spandorfer S, Fasouliotis SJ, Kashyap S, Rosenwaks Z. Taking a basal follicle-stimulating hormone history is essential before initiating in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2005 Jan;83(1):37–41.
43. Abdalla H, Thum MY. Repeated testing of basal FSH levels has no predictive value for IVF outcome in women with elevated basal FSH. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2006 Jan;21(1):171–4.
44. Scott RT, Hofmann GE, Oehninger S, Muasher SJ. Intercycle variability of day 3 follicle-stimulating hormone levels and its effect on stimulation quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1990 Aug;54(2):297–302.
45. Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Serum antimüllerian hormone/müllerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril*. 2004 Nov;82(5):1323–9.
46. Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T i sur. Dynamic assays of inhibin B, anti-Müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod*. 2005 Nov 1;20(11):3178–83.
47. Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA. Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1998 Jun;69(6):1010–4.
48. Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 1995 Dec;64(6):1136–40.



49. Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1995 Nov;64(5):991–4.
50. McIlveen M, Skull JD, Ledger WL. Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2007 Mar;22(3):778–85.
51. Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2005 Oct;112(10):1384–90.
52. Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2004 Nov;111(11):1248–53.
53. Balasch J, Creus M, Fábregues F, Carmona F, Casamitjana R, Ascaso C i sur. Inhibin, follicle-stimulating hormone, and age as predictors of ovarian response in in vitro fertilization cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. *Am J Obstet Gynecol*. 1996 Nov;175(5):1226–30.
54. Hall JE, Welt CK, Cramer DW. Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1999 Feb;14(2):409–15.
55. Creus M, Peñarrubia J, Fábregues F, Vidal E, Carmona F, Casamitjana R i sur. Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2000 Nov;15(11):2341–6.
56. Smeenk MJJ, Sweep FCGJ, Zielhuis GA, Kremer JAM, Thomas CMG, Braat DDM. Antimüllerian hormone predicts ovarian responsiveness, but not embryo quality or pregnancy, after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2007 Jan;87(1):223–6.
57. Vigier B, Tran D, Legeai L, Bézard J, Josso N. Origin of anti-Müllerian hormone in bovine freemartin fetuses. *J Reprod Fertil*. 1984 Mar;70(2):473–9.

58. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA i sur. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999 Dec;140(12):5789–96.
59. Weenen C, Laven JSE, Von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA i sur. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*. 2004 Feb;10(2):77–83.
60. Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reprod Camb Engl*. 2002 Nov;124(5):601–9.
61. Sowers MR, Eyvazzadeh AD, McConnell D, Yosef M, Jannausch ML, Zhang D i sur. Anti-mullerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Sep;93(9):3478–83.
62. van Rooij IAJ, Broekmans FJM, Scheffer GJ, Looman CWN, Habbema JDF, de Jong FH i sur. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril*. 2005 Apr;83(4):979–87.
63. Fanchin R, Taieb J, Lozano DHM, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2005 Apr;20(4):923–7.
64. Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy C, Englert Y. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2007 Jul;22(7):1837–40.
65. Hehenkamp WJK, Looman CWN, Themmen APN, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJM. Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Oct;91(10):4057–63.
66. Broer SL, Broekmans FJM, Laven JSE, Fauser BCJM. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Hum Reprod Update*. 2014;20(5):688–701.

67. Fiçicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2006 Mar;85(3):592–6.
68. Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2008 Jun;23(6):1359–65.
69. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 1996 Apr;17(2):121–55.
70. Pache TD, Wladimiroff JW, de Jong FH, Hop WC, Fauser BC. Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril*. 1990 Oct;54(4):638–42.
71. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril*. 1999 Nov;72(5):845–51.
72. Hendriks DJ, Mol BWJ, Bancsi LFJMM, Te Velde ER, Broekmans FJM. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril*. 2005 Feb;83(2):291–301.
73. Bancsi LFJMM, Broekmans FJM, Eijkemans MJC, de Jong FH, Habbema JDF, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2002 Feb;77(2):328–36.
74. Frattarelli JL, Lauria-Costab DF, Miller BT, Bergh PA, Scott RT. Basal antral follicle number and mean ovarian diameter predict cycle cancellation and ovarian responsiveness in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril*. 2000 Sep;74(3):512–7.
75. Frattarelli JL, Levi AJ, Miller BT, Segars JH. A prospective assessment of the predictive value of basal antral follicles in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2003 Aug;80(2):350–5.

76. Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D, Vujisic S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril*. 2003 Jan;79(1):190–7.
77. Ovarian Stimulation TEGGO, Bosch E, Broer S, Griesinger G, Grynberg M, Humaidan P i sur. ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI†. *Hum Reprod Open*. 2020;2020(2):hoaa009.
78. Drakopoulos P, Blockeel C, Stoop D, Camus M, de Vos M, Tournaye H i sur. Conventional ovarian stimulation and single embryo transfer for IVF/ICSI. How many oocytes do we need to maximize cumulative live birth rates after utilization of all fresh and frozen embryos? *Hum Reprod Oxf Engl*. 2016 Feb;31(2):370–6.
79. Keay SD, Liversedge NH, Mathur RS, Jenkins JM. Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation. *Br J Obstet Gynaecol*. 1997 May;104(5):521–7.
80. Ubaldi F, Vaiarelli A, D’Anna R, Rienzi L. Management of poor responders in IVF: is there anything new? *BioMed Res Int*. 2014;2014:352098.
81. Chiang JL, Shukla P, Pagidas K, Ahmed NS, Karri S, Gunn DD i sur. Mitochondria in Ovarian Aging and Reproductive Longevity. *Ageing Res Rev*. 2020 Nov;63:101168.
82. Blumenfeld Z. What Is the Best Regimen for Ovarian Stimulation of Poor Responders in ART/IVF? *Front Endocrinol*. 2020;11:192.
83. Sampo AV, Palena C, Ganzer L, Maccari V, Estofán G, Hernández M. The adverse effect of overweight in assisted reproduction treatment outcomes. *JBRA Assist Reprod*. 2017 Sep 1;21(3):212–6.
84. La Marca A, Papaleo E, Alviggi C, Ruvolo G, De Placido G, Candiani M i sur. The combination of genetic variants of the FSHB and FSHR genes affects serum FSH in women of reproductive age. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2013 May;28(5):1369–74.
85. Alviggi C, Conforti A, Caprio F, Gizzo S, Noventa M, Strina I i sur. In Estimated Good Prognosis Patients Could Unexpected ‘Hyporesponse’ to Controlled Ovarian Stimulation

- be Related to Genetic Polymorphisms of FSH Receptor? *Reprod Sci* Thousand Oaks Calif. 2016 Aug;23(8):1103–8.
86. Alviggi C, Clarizia R, Pettersson K, Mollo A, Humaidan P, Strina I i sur. Suboptimal response to GnRHa long protocol is associated with a common LH polymorphism. *Reprod Biomed Online*. 2011 Feb;22 Suppl 1:S67-72.
87. Oudendijk JF, Yarde F, Eijkemans MJC, Broekmans FJM, Broer SL. The poor responder in IVF: is the prognosis always poor?: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2012 Feb;18(1):1–11.
88. Garcia JE, Jones GS, Acosta AA, Wright G. Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: phase II, 1981. *Fertil Steril*. 1983 Feb;39(2):174–9.
89. Polyzos NP, Devroey P. A systematic review of randomized trials for the treatment of poor ovarian responders: is there any light at the end of the tunnel? *Fertil Steril*. 2011 Nov;96(5):1058-1061.e7.
90. Younis JS, Ben-Ami M, Ben-Shlomo I. The Bologna criteria for poor ovarian response: a contemporary critical appraisal. *J Ovarian Res*. 2015 Nov 17;8:76.
91. Poseidon Group (Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number), Alviggi C, Andersen CY, Buehler K, Conforti A, De Placido G, et al. A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept. *Fertil Steril*. 2016 Jun;105(6):1452–3.
92. Xiao J song, Su C mei, Zeng X tao. Comparisons of GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol in supposed normal ovarian responders undergoing IVF: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*. 2014;9(9):e106854.
93. Lambalk CB, Banga FR, Huirne JA, Toftager M, Pinborg A, Homburg R i sur. GnRH antagonist versus long agonist protocols in IVF: a systematic review and meta-analysis accounting for patient type. *Hum Reprod Update*. 2017 Sep 1;23(5):560–79.

94. Weissman A, Farhi J, Royburt M, Nahum H, Glezerman M, Levran D. Prospective evaluation of two stimulation protocols for low responders who were undergoing in vitro fertilization–embryo transfer. *Fertil Steril*. 2003 Apr 1;79(4):886–92.
95. Sunkara SK, Coomarasamy A, Faris R, Braude P, Khalaf Y. Long gonadotropin-releasing hormone agonist versus short agonist versus antagonist regimens in poor responders undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2014 Jan;101(1):147–53.
96. Battaglia C, Salvatori M, Maxia N, Petraglia F, Facchinetti F, Volpe A. Adjuvant L-arginine treatment for in-vitro fertilization in poor responder patients. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1999 Jul;14(7):1690–7.
97. Cedrin-Durnerin I, Bständig B, Hervé F, Wolf J, Uzan M, Hugues J. A comparative study of high fixed-dose and decremental-dose regimens of gonadotropins in a minidose gonadotropin-releasing hormone agonist flare protocol for poor responders. *Fertil Steril*. 2000 May;73(5):1055–6.
98. van Hooff MH, Alberda AT, Huisman GJ, Zeilmaker GH, Leerentveld RA. Doubling the human menopausal gonadotrophin dose in the course of an in-vitro fertilization treatment cycle in low responders: a randomized study. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1993 Mar;8(3):369–73.
99. Hofmann GE, Toner JP, Muasher SJ, Jones GS. High-dose follicle-stimulating hormone (FSH) ovarian stimulation in low-responder patients for in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1989 Oct 1;6(5):285–9.
100. Karande V, Gleicher N. A rational approach to the management of low responders in in-vitro fertilization. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1999 Jul;14(7):1744–8.
101. Land JA, Yarmolinskaya MI, Dumoulin JC, Evers JL. High-dose human menopausal gonadotropin stimulation in poor responders does not improve in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 1996 May;65(5):961–5.
102. De Placido G, Alviggi C, Mollo A, Strina I, Varricchio MT, Molis M. Recombinant follicle stimulating hormone is effective in poor responders to highly purified follicle stimulating hormone. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2000 Jan;15(1):17–20.

103. Moreno C, Ruiz A, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Intracytoplasmic sperm injection as a routine indication in low responder patients. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1998 Aug;13(8):2126–9.
104. Raga F, Bonilla-Musoles F, Casañ EM, Bonilla F. Recombinant follicle stimulating hormone stimulation in poor responders with normal basal concentrations of follicle stimulating hormone and oestradiol: improved reproductive outcome. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1999 Jun;14(6):1431–4.
105. Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2003;9(1):61–76.
106. Ezra O, Haas J, Nahum R, Maman E, Cohen Y, Segev-Zahav A i sur. Do poor-responder patients undergoing IVF benefit from splitting and increasing the daily gonadotropin dose? *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol.* 2019 Oct;35(10):890–3.
107. Kim CH, Kim SR, Cheon YP, Kim SH, Chae HD, Kang BM. Minimal stimulation using gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist and recombinant human follicle-stimulating hormone versus GnRH antagonist multiple-dose protocol in low responders undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2009 Dec;92(6):2082–4.
108. Morgia F, Sbracia M, Schimberni M, Giallonardo A, Piscitelli C, Giannini P i sur. A controlled trial of natural cycle versus microdose gonadotropin-releasing hormone analog flare cycles in poor responders undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004 Jun;81(6):1542–7.
109. Barash OO, Hinckley MD, Rosenbluth EM, Ivani KA, Weckstein LN. High gonadotropin dosage does not affect euploidy and pregnancy rates in IVF PGS cycles with single embryo transfer. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2017 Nov 1;32(11):2209–17.
110. Labarta E, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C i sur. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2011 Jul;26(7):1813–25.

111. Sekhon L, Shaia K, Santistevan A, Cohn KH, Lee JA, Beim PY i sur. The cumulative dose of gonadotropins used for controlled ovarian stimulation does not influence the odds of embryonic aneuploidy in patients with normal ovarian response. *J Assist Reprod Genet.* 2017 Jun;34(6):749–58.
112. Wu Q, Li H, Zhu Y, Jiang W, Lu J, Wei D i sur. Dosage of exogenous gonadotropins is not associated with blastocyst aneuploidy or live-birth rates in PGS cycles in Chinese women. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2018 Oct 1;33(10):1875–82.
113. Polyzos NP, Blockeel C, Verpoest W, De Vos M, Stoop D, Vloeberghs i sur. Live birth rates following natural cycle IVF in women with poor ovarian response according to the Bologna criteria. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2012 Dec;27(12):3481–6.
114. Kedem A, Tsur A, Haas J, Yerushalmi GM, Hourvitz A, Machtinger R i sur. Is the modified natural in vitro fertilization cycle justified in patients with ‘genuine’ poor response to controlled ovarian hyperstimulation? *Fertil Steril.* 2014 Jun;101(6):1624–8.
115. Ashrafi M, Ashtiani SK, Zafarani F, Samani RO, Eshrati B. Evaluation of ovulation induction protocols for poor responders undergoing assisted reproduction techniques. *Saudi Med J.* 2005 Apr;26(4):593–6.
116. Bastu E, Buyru F, Ozsurmeli M, Demiral I, Dogan M, Yeh J. A randomized, single-blind, prospective trial comparing three different gonadotropin doses with or without addition of letrozole during ovulation stimulation in patients with poor ovarian response. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016 Aug;203:30–4.
117. Goswami SK, Das T, Chattopadhyay R, Sawhney V, Kumar J, Chaudhury K, et al. A randomized single-blind controlled trial of letrozole as a low-cost IVF protocol in women with poor ovarian response: a preliminary report. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2004 Sep;19(9):2031–5.
118. Klinkert ER, Broekmans FJM, Looman CWN, Habbema JDF, te Velde ER. Expected poor responders on the basis of an antral follicle count do not benefit from a higher starting dose of gonadotrophins in IVF treatment: a randomized controlled trial. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2005 Mar;20(3):611–5.



119. Liu X, Li T, Wang B, Xiao X, Liang X, Huang R. Mild stimulation protocol vs conventional controlled ovarian stimulation protocol in poor ovarian response patients: a prospective randomized controlled trial. *Arch Gynecol Obstet*. 2020 May;301(5):1331–9.
120. Ragni G, Levi-Setti PE, Fadini R, Brigante C, Scarduelli C, Alagna F i sur. Clomiphene citrate versus high doses of gonadotropins for in vitro fertilisation in women with compromised ovarian reserve: a randomised controlled non-inferiority trial. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2012 Dec 18;10:114.
121. Revelli A, Chiadò A, Dalmaso P, Stabile V, Evangelista F, Basso G i sur. ‘Mild’ vs. ‘long’ protocol for controlled ovarian hyperstimulation in patients with expected poor ovarian responsiveness undergoing in vitro fertilization (IVF): a large prospective randomized trial. *J Assist Reprod Genet*. 2014 Jul;31(7):809–15.
122. van Tilborg TC, Torrance HL, Oudshoorn SC, Eijkemans MJC, Koks CAM, Verhoeve HR i sur. Individualized versus standard FSH dosing in women starting IVF/ICSI: an RCT. Part 1: The predicted poor responder. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2017 Dec 1;32(12):2496–505.
123. Youssef MA, van Wely M, Al-Inany H, Madani T, Jahangiri N, Khodabakhshi S i sur. A mild ovarian stimulation strategy in women with poor ovarian reserve undergoing IVF: a multicenter randomized non-inferiority trial. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2017 Jan;32(1):112–8.
124. Yu R, Jin H, Huang X, Lin J, Wang P. Comparison of modified agonist, mild-stimulation and antagonist protocols for in vitro fertilization in patients with diminished ovarian reserve. *J Int Med Res*. 2018 Jun;46(6):2327–37.
125. Pilehvari S, ShahrokhTehraninejad E, Hosseinrashidi B, Keikhah F, Haghollahi F, Azimineko E. Comparison Pregnancy Outcomes Between Minimal Stimulation Protocol and Conventional GnRH Antagonist Protocols in Poor Ovarian Responders. *J Fam Reprod Health*. 2016 Mar;10(1):35–42.
126. Mohsen IA, El Din RE. Minimal stimulation protocol using letrozole versus microdose flare up GnRH agonist protocol in women with poor ovarian response undergoing ICSI. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2013 Feb;29(2):105–8.

127. Huang R, Wang B, Yang X, Li TT, Liang XY. The comparison of mild stimulation vs. Controlled ovarian hyperstimulation protocol in poor ovarian responders: a prospective randomized study. In: Human Reproduction. OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND; 2015. p. 49–50.
128. Datta AK, Maheshwari A, Felix N, Campbell S, Nargund G. Mild versus conventional ovarian stimulation for IVF in poor, normal and hyper-responders: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2021 Feb 19;27(2):229–53.
129. Nencioni T, Miragoli A, Dorato F, Cartella C, Polvani F. Mechanism of action of clomiphene citrate. Ann Ostet Ginecol Med Perinat. 1977;98(1):28–42.
130. Haas J, Casper RF. In vitro fertilization treatments with the use of clomiphene citrate or letrozole. Fertil Steril. 2017 Oct;108(4):568–71.
131. Schimberni M, Ciardo F, Schimberni M, Giallonardo A, De Pratti V, Sbracia M. Short gonadotropin-releasing hormone agonist versus flexible antagonist versus clomiphene citrate regimens in poor responders undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016 Oct;20(20):4354–61.
132. Kamath MS, Maheshwari A, Bhattacharya S, Lor KY, Gibreel A. Oral medications including clomiphene citrate or aromatase inhibitors with gonadotropins for controlled ovarian stimulation in women undergoing in vitro fertilisation. Cochrane Database Syst Rev. 2017 Nov 2;11(11):CD008528.
133. Song D, Shi Y, Zhong Y, Meng Q, Hou S, Li H. Efficiency of mild ovarian stimulation with clomiphene on poor ovarian responders during IVF\ICSI procedures: a meta-analysis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2016 Sep;204:36–43.
134. Bechtejew TN, Nadai MN, Nastri CO, Martins WP. Clomiphene citrate and letrozole to reduce follicle-stimulating hormone consumption during ovarian stimulation: systematic review and meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol. 2017 Sep;50(3):315–23.
135. Zhang Y, Zhang C, Shu J, Guo J, Chang HM, Leung PCK i sur. Adjuvant treatment strategies in ovarian stimulation for poor responders undergoing IVF: a systematic review and network meta-analysis. Hum Reprod Update. 2020 Feb 28;26(2):247–63.

136. Mitwally MFM, Casper RF. Aromatase inhibition improves ovarian response to follicle-stimulating hormone in poor responders. *Fertil Steril*. 2002 Apr;77(4):776–80.
137. Akhtar M, Njar VC, Wright JN. Mechanistic studies on aromatase and related C-C bond cleaving P-450 enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1993 Mar;44(4–6):375–87.
138. Ebrahimi M, Akbari-Asbagh F, Ghalandar-Attar M. Letrozole+ GnRH antagonist stimulation protocol in poor ovarian responders undergoing intracytoplasmic sperm injection cycles: An RCT. *Int J Reprod Biomed*. 2017 Feb;15(2):101–8.
139. Yang X, Lin G, Lu G, Gong F. Letrozole supplementation during controlled ovarian stimulation in expected high responders: a pilot randomized controlled study. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2019 May 10;17(1):43.
140. Madani T, Hemat M, Arabipoor A, Khodabakhshi SH, Zolfaghari Z. Double mild stimulation and egg collection in the same cycle for management of poor ovarian responders. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2019 May;48(5):329–33.
141. Vaiarelli A, Cimadomo D, Argento C, Ubaldi N, Trabucco E, Drakopoulos P i sur. Double stimulation in the same ovarian cycle (DuoStim) is an intriguing strategy to improve oocyte yield and the number of competent embryos in a short timeframe. *Minerva Ginecol*. 2019 Oct;71(5):372–6.
142. Labarta E. DuoStim: a new strategy proposed for women with poor ovarian response. *Fertil Steril*. 2020 Jan;113(1):76–7.
143. Giannelou P, Simopoulou M, Grigoriadis S, Makrakis E, Kontogeorgi A, Pantou A i sur. The Conundrum of Poor Ovarian Response: From Diagnosis to Treatment. *Diagnostics*. 2020 Sep 11;10(9):687.
144. Yakin K, Urman B. DHEA as a miracle drug in the treatment of poor responders; hype or hope? *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011 Aug;26(8):1941–4.
145. Noventa M, Vitagliano A, Andrisani A, Blaganje M, Viganò P, Papaelo E i sur. Testosterone therapy for women with poor ovarian response undergoing IVF: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Assist Reprod Genet*. 2019 Apr;36(4):673–83.

146. Nagels HE, Rishworth JR, Siristatidis CS, Kroon B. Androgens (dehydroepiandrosterone or testosterone) for women undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Nov 26;(11):CD009749.
147. Yeung TWY, Chai J, Li RHW, Lee VCY, Ho PC, Ng EHY. A randomized, controlled, pilot trial on the effect of dehydroepiandrosterone on ovarian response markers, ovarian response, and in vitro fertilization outcomes in poor responders. *Fertil Steril.* 2014 Jul;102(1):108-115.e1.
148. Bosdou JK, Venetis CA, Kolibianakis EM, Toulis KA, Goulis DG, Zepiridis L i sur. The use of androgens or androgen-modulating agents in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2012;18(2):127–45.
149. Narkwichean A, Maalouf W, Campbell BK, Jayaprakasan K. Efficacy of dehydroepiandrosterone to improve ovarian response in women with diminished ovarian reserve: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 2013 May 16;11:44.
150. Norman RJ, Hart RJ. Human growth hormone use in poor ovarian response – caution and opportunities. *Ther Adv Reprod Health.* 2021 Mar 19;15:2633494121999420.
151. Lattes K, Brassesco M, Gomez M, Checa MA. Low-dose growth hormone supplementation increases clinical pregnancy rate in poor responders undergoing in vitro fertilisation. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol.* 2015 Jul;31(7):565–8.
152. Xu YM, Hao GM, Gao BL. Application of Growth Hormone in in vitro Fertilization. *Front Endocrinol.* 2019;10:502.
153. Hart RJ. Use of Growth Hormone in the IVF Treatment of Women With Poor Ovarian Reserve. *Front Endocrinol.* 2019;10:500.
154. Norman RJ, Alvino H, Hull LM, Mol BW, Hart RJ, Kelly TL i sur. Human growth hormone for poor responders: a randomized placebo-controlled trial provides no evidence for improved live birth rate. *Reprod Biomed Online.* 2019 Jun;38(6):908–15.

155. Caprio F, D'Eufemia MD, Trotta C, Campitiello MR, Ianniello R, Mele D i sur. Myo-inositol therapy for poor-responders during IVF: a prospective controlled observational trial. *J Ovarian Res.* 2015 Jun 12;8:37.
156. Xu Y, Nisenblat V, Lu C, Li R, Qiao J, Zhen X i sur. Pretreatment with coenzyme Q10 improves ovarian response and embryo quality in low-prognosis young women with decreased ovarian reserve: a randomized controlled trial. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 2018 Mar 27;16(1):29.
157. Rodríguez-Varela C, Herraiz S, Labarta E. Mitochondrial enrichment in infertile patients: a review of different mitochondrial replacement therapies. *Ther Adv Reprod Health.* 2021 Jun 28;15:26334941211023544.
158. Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Stojanovic P. Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components. *Open Med Wars Pol.* 2016;11(1):242–7.
159. Ramaswamy Reddy SH, Reddy R, Babu NC, Ashok GN. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: A review on pros and cons of the technologies. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP.* 2018;22(3):367–74.
160. Zadehmodarres S, Salehpour S, Saharkhiz N, Nazari L. Treatment of thin endometrium with autologous platelet-rich plasma: a pilot study. *JBRA Assist Reprod.* 2017 Feb 1;21(1):54–6.
161. Farimani M, Poorolajal J, Rabiee S, Bahmanzadeh M. Successful pregnancy and live birth after intrauterine administration of autologous platelet-rich plasma in a woman with recurrent implantation failure: A case report. *Int J Reprod Biomed.* 2017 Dec;15(12):803–6.
162. Pantos K, Simopoulou M, Pantou A, Rapani A, Tsioulou P, Nitsos N i sur. A Case Series on Natural Conceptions Resulting in Ongoing Pregnancies in Menopausal and Prematurely Menopausal Women Following Platelet-Rich Plasma Treatment. *Cell Transplant.* 2019;28(9–10):1333–40.
163. Peterson JE, Zurakowski D, Italiano JE, Michel LV, Fox L, Klement GL i sur. Normal ranges of angiogenesis regulatory proteins in human platelets. *Am J Hematol.* 2010 Jul;85(7):487–93.

164. Aflatoonian A, Lotfi M, Saeed L, Tabibnejad N. Effects of Intraovarian Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma on Ovarian Rejuvenation in Poor Responders and Women with Primary Ovarian Insufficiency. *Reprod Sci* Thousand Oaks Calif. 2021 Jul;28(7):2050–9.
165. Sfakianoudis K, Simopoulou M, Nitsos N, Rapani A, Pantou A, Vaxevanoglou T i sur. A Case Series on Platelet-Rich Plasma Revolutionary Management of Poor Responder Patients. *Gynecol Obstet Invest*. 2019;84(1):99–106.
166. Sfakianoudis K, Simopoulou M, Nitsos N, Rapani A, Pappas A, Pantou A i sur. Autologous Platelet-Rich Plasma Treatment Enables Pregnancy for a Woman in Premature Menopause. *J Clin Med*. 2018 Dec 20;8(1):1.
167. Farimani M, Heshmati S, Poorolajal J, Bahmanzadeh M. A report on three live births in women with poor ovarian response following intra-ovarian injection of platelet-rich plasma (PRP). *Mol Biol Rep*. 2019 Apr;46(2):1611–6.
168. Hendriks DJ, te Velde ER, Looman CWN, Bancsi LFJMM, Broekmans FJM. Expected poor ovarian response in predicting cumulative pregnancy rates: a powerful tool. *Reprod Biomed Online*. 2008 Nov;17(5):727–36.
169. De Sutter P, Dhont M. Poor response after hormonal stimulation for in vitro fertilization is not related to ovarian aging. *Fertil Steril*. 2003 Jun;79(6):1294–8.
170. Galey-Fontaine J, Cédrin-Durnerin I, Chaïbi R, Massin N, Hugues JN. Age and ovarian reserve are distinct predictive factors of cycle outcome in low responders. *Reprod Biomed Online*. 2005 Jan;10(1):94–9.
171. Baka S, Makrakis E, Tzanakaki D, Konidaris S, Hassiakos D, Moustakarias T, et al. Poor responders in IVF: cancellation of a first cycle is not predictive of a subsequent failure. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Dec;1092:418–25.
172. Timeva T, Milachich T, Antonova I, Arabaji T, Shterev A, Omar HA. Correlation between number of retrieved oocytes and pregnancy rate after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm infection. *ScientificWorldJournal*. 2006 Jun 21;6:686–90.

173. van der Gaast MH, Eijkemans MJC, van der Net JB, de Boer EJ, Burger CW, van Leeuwen FE i sur. Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reprod Biomed Online*. 2006 Oct;13(4):476–80.
174. Saldeen P, Källén K, Sundström P. The probability of successful IVF outcome after poor ovarian response. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2007;86(4):457–61.
175. Zhen XM, Qiao J, Li R, Wang LN, Liu P. The clinical analysis of poor ovarian response in in-vitro-fertilization embryo-transfer among Chinese couples. *J Assist Reprod Genet*. 2008 Jan;25(1):17–22.
176. Haahr T, Esteves SC, Humaidan P. Individualized controlled ovarian stimulation in expected poor-responders: an update. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2018 Mar 9;16(1):20.
177. Loumaye E. The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1990 May;5(4):357–76.
178. Daya S. Optimal protocol for gonadotrophin releasing hormone agonist use in ovarian stimulation. In: *In vitro fertilization and assisted reproduction*. Monduzzi, Bologna; 1997. p. 405–10.
179. Sharma V, Williams J, Collins W, Riddle A, Mason B, Whitehead M. The sequential use of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) agonist and human menopausal gonadotropins to stimulate folliculogenesis in patients with resistant ovaries. *J Vitro Fertil Embryo Transf IVF*. 1988 Feb;5(1):38–42.
180. Neveu S, Hedon B, Bringer J, Chinchole JM, Arnal F, Humeau C i sur. Ovarian stimulation by a combination of a gonadotropin-releasing hormone agonist and gonadotropins for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1987 Apr;47(4):639–43.
181. Cummins JM, Yovich JM, Edirisinghe WR, Yovich JL. Pituitary down-regulation using leuprolide for the intensive ovulation management of poor prognosis patients having in vitro fertilization (IVF)-related treatments. *J Vitro Fertil Embryo Transf IVF*. 1989 Dec;6(6):345–52.

182. Serafini P, Stone B, Kerin J, Batzofin J, Quinn P, Marrs RP. An alternate approach to controlled ovarian hyperstimulation in 'poor responders': pretreatment with a gonadotropin-releasing hormone analog. *Fertil Steril*. 1988 Jan;49(1):90–5.
183. Muasher SJ. Treatment of low responders. *J Assist Reprod Genet*. 1993 Feb;10(2):112–4.
184. Brzyski RG, Jones GS, Oehninger S, Acosta AA, Kruithoff CH, Muasher SJ. Impact of leuprolide acetate on the response to follicular stimulation for in vitro fertilization in patients with normal basal gonadotropin levels. *J Vitro Fertil Embryo Transf IVF*. 1989 Oct;6(5):290–3.
185. Sathanandan M, Warnes GM, Kirby CA, Petrucco OM, Matthews CD. Adjuvant leuprolide in normal, abnormal, and poor responders to controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization/gamete intrafallopian transfer. *Fertil Steril*. 1989 Jun;51(6):998–1006.
186. Droesch K, Muasher SJ, Brzyski RG, Jones GS, Simonetti S, Liu HC i sur. Value of suppression with a gonadotropin-releasing hormone agonist prior to gonadotropin stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1989 Feb;51(2):292–7.
187. Garcia JE, Padilla SL, Bayati J, Baramki TA. Follicular phase gonadotropin-releasing hormone agonist and human gonadotropins: a better alternative for ovulation induction in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1990 Feb;53(2):302–5.
188. Padilla SL, Dugan K, Maruschak V, Shalika S, Smith RD. Use of the flare-up protocol with high dose human follicle stimulating hormone and human menopausal gonadotropins for in vitro fertilization in poor responders. *Fertil Steril*. 1996 Apr;65(4):796–9.
189. Gelety TJ, Pearlstone AC, Surrey ES. Short-term endocrine response to gonadotropin-releasing hormone agonist initiated in the early follicular, midluteal, or late luteal phase in normally cycling women. *Fertil Steril*. 1995 Dec;64(6):1074–80.
190. San Roman GA, Surrey ES, Judd HL, Kerin JF. A prospective randomized comparison of luteal phase versus concurrent follicular phase initiation of gonadotropin-releasing hormone agonist for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1992 Oct;58(4):744–9.



191. Scott RT, Navot D. Enhancement of ovarian responsiveness with microdoses of gonadotropin-releasing hormone agonist during ovulation induction for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1994 May;61(5):880–5.
192. Schoolcraft W, Schlenker T, Gee M, Stevens J, Wagley L. Improved controlled ovarian hyperstimulation in poor responder in vitro fertilization patients with a microdose follicle-stimulating hormone flare, growth hormone protocol. *Fertil Steril*. 1997 Jan;67(1):93–7.
193. Surrey ES, Bower J, Hill DM, Ramsey J, Surrey MW. Clinical and endocrine effects of a microdose GnRH agonist flare regimen administered to poor responders who are undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1998 Mar;69(3):419–24.
194. Demiroglu A, Gurgan T. Comparison of microdose flare-up and antagonist multiple-dose protocols for poor-responder patients: a randomized study. *Fertil Steril*. 2009 Aug;92(2):481–5.
195. Merviel P, Cabry-Goubet R, Lourdel E, Devaux A, Belhadri-Mansouri N, Copin H et al. Comparative prospective study of 2 ovarian stimulation protocols in poor responders: effect on implantation rate and ongoing pregnancy. *Reprod Health*. 2015 May 30;12:52.
196. Al-Inany H, Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI. Optimizing GnRH antagonist administration: meta-analysis of fixed versus flexible protocol. *Reprod Biomed Online*. 2005 May;10(5):567–70.
197. Escudero E, Bosch E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Comparison of two different starting multiple dose gonadotropin-releasing hormone antagonist protocols in a selected group of in vitro fertilization-embryo transfer patients. *Fertil Steril*. 2004 Mar;81(3):562–6.
198. Mochtar MH, Dutch Ganirelix Study Group. The effect of an individualized GnRH antagonist protocol on folliculogenesis in IVF/ICSI. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2004 Aug;19(8):1713–8.
199. Hossein Rashidi B, Behrouzi Lak T, ShahrokhTehrani E, Davari Tanha F. Fixed versus Flexible Gonadotropin Releasing Hormone Antagonist Protocol in Controlled Ovarian Stimulation for In vitro Fertilization in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Fam Reprod Health*. 2015 Sep;9(3):141–6.

200. Depalo R, Trerotoli P, Chincoli A, Vacca MP, Lamanna G, Cicinelli E. Endogenous luteinizing hormone concentration and IVF outcome during ovarian stimulation in fixed versus flexible GnRH antagonist protocols: An RCT. *Int J Reprod Biomed.* 2018 Mar;16(3):175–82.
201. Luo X, Pei L, Li F, Li C, Huang G, Ye H. Fixed versus flexible antagonist protocol in women with predicted high ovarian response except PCOS: a randomized controlled trial. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2021 May 2;21(1):348.
202. Al-Inany H, Aboulghar M. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001;(4):CD001750.
203. European and Middle East Orgalutran Study Group. Comparable clinical outcome using the GnRH antagonist ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH surges in women undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2001 Apr;16(4):644–51.
204. Farquhar CM, Wang YA, Sullivan EA. A comparative analysis of assisted reproductive technology cycles in Australia and New Zealand 2004-2007. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2010 Sep;25(9):2281–9.
205. Griesinger G, Kolibianakis EM, Venetis C, Diedrich K, Tarlatzis B. Oral contraceptive pretreatment significantly reduces ongoing pregnancy likelihood in gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles: an updated meta-analysis. *Fertil Steril.* 2010 Nov;94(6):2382–4.
206. Venetis CA, Storr A, Chua SJ, Mol BW, Longobardi S, Yin X i sur. What is the optimal GnRH antagonist protocol for ovarian stimulation during ART treatment? A systematic review and network meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2023 Jan 3;dmac040.
207. Hernandez ER. Embryo implantation and GnRH antagonists: embryo implantation: the Rubicon for GnRH antagonists. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2000 Jun;15(6):1211–6.
208. Albano C, Felberbaum RE, Smitz J, Riethmüller-Winzen H, Engel J, Diedrich K i sur. Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetrorelix

- and the LHRH-agonist buserelin. European Cetrorelix Study Group. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2000 Mar;15(3):526–31.
209. Borm G, Mannaerts B. Treatment with the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone is effective, safe and convenient: results of a controlled, randomized, multicentre trial. The European Orgalutran Study Group. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2000 Jul;15(7):1490–8.
210. Olivennes F, Belaisch-Allart J, Empereire JC, Dechaud H, Alvarez S, Moreau L i sur. Prospective, randomized, controlled study of in vitro fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist (cetrorelix) or a depot formula of an LH-RH agonist (triptorelin). *Fertil Steril.* 2000 Feb;73(2):314–20.
211. Fluker M, Grifo J, Leader A, Levy M, Meldrum D, Muasher SJ i sur. Efficacy and safety of ganirelix acetate versus leuprolide acetate in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril.* 2001 Jan;75(1):38–45.
212. Tannus S, Weissman A, Boaz M, Horowitz E, Ravhon A, Golan A i sur. The effect of delayed initiation of gonadotropin-releasing hormone antagonist in a flexible protocol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril.* 2013 Mar 1;99(3):725–30.
213. Ozturk Inal Z, Yilmaz N, Inal HA, Hancerliogullari N, Coskun B. Are there any differences between antagonist administration on days  $<6$  and  $\geq 6$  of Controlled Ovarian Hyperstimulation on assisted reproductive technique outcomes? *J Chin Med Assoc JCMA.* 2018 Jan;81(1):53–7.
214. Weissman A, Tannus S, Horowitz E, Ravhon A, Barkat J, Levran D. Fixed versus flexible GnRH antagonist protocols: who makes the difference? *Fertil Steril.* 2012 Sep 1;98(3):S178.
215. Montik N, Piemontese M, Cecchi L, Carpini GD, Serri M, Ciavattini A. Fixed versus flexible GnRH antagonist protocol in controlled ovarian stimulation for in vitro fertilisation performed with Corifollitropin  $\alpha$ . *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016 Sep 8;48:122–122.

216. Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Sep;85(9):3365–9.
217. Loutradis D, Patsoula E, Minas V, Koussidis GA, Antsaklis A, Michalas S, et al. FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs. *J Assist Reprod Genet.* 2006 Apr;23(4):177–84.
218. van Tilborg TC, Eijkemans MJ, Laven JS, Koks CA, de Bruin JP, Scheffer GJ i sur. The OPTIMIST study: optimisation of cost effectiveness through individualised FSH stimulation dosages for IVF treatment. A randomised controlled trial. *BMC Womens Health.* 2012 Sep 18;12:29.
219. Polyzos NP, Popovic-Todorovic B. SAY NO to mild ovarian stimulation for all poor responders: it is time to realize that not all poor responders are the same. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2020 Sep 1;35(9):1964–71.
220. Sunkara SK, Polyzos NP. OPTIMIST trial: optimistic evidence? *Hum Reprod Oxf Engl.* 2018 May 1;33(5):983–4.
221. La Marca A, Blockeel C, Bosch E, Fanchin R, Fatemi HM, Fauser BC, et al. Individualized FSH dosing improves safety and reduces iatrogenic poor response while maintaining live-birth rates. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2018 May 1;33(5):982–3.
222. Lensen SF, Wilkinson J, Leijdekkers JA, La Marca A, Mol BWJ, Marjoribanks J i sur. Individualised gonadotropin dose selection using markers of ovarian reserve for women undergoing in vitro fertilisation plus intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI). *Cochrane Database Syst Rev.* 2018 Feb 1;2(2):CD012693.
223. Boudry L, Racca A, Tournaye H, Blockeel C. Type and dose of gonadotropins in poor ovarian responders: does it matter? *Ther Adv Reprod Health.* 2021 Jun 27;15:26334941211024204.
224. Oudendijk JF, Yarde F, Eijkemans MJC, Broekmans FJM, Broer SL. The poor responder in IVF: is the prognosis always poor?: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2012;18(1):1–11.

225. Broer SL, van Disseldorp J, Broeze KA, Dolleman M, Opmeer BC, Bossuyt P i sur. 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(1):26–36.
226. van Loendersloot LL, van Wely M, Limpens J, Bossuyt PMM, Repping S, van der Veen F. Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2010;16(6):577–89.
227. Bartmann AK, Romão GS, Ramos E da S, Ferriani RA. Why do older women have poor implantation rates? A possible role of the mitochondria. *J Assist Reprod Genet*. 2004 Mar;21(3):79–83.
228. de Bruin JP, Dorland M, Spek ER, Posthuma G, van Haaften M, Looman CWN i sur. Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries. *Biol Reprod*. 2004 Feb;70(2):419–24.
229. Vega M, Breborowicz A, Moshier EL, McGovern PG, Keltz MD. Blastulation rates decline in a linear fashion from euploid to aneuploid embryos with single versus multiple chromosomal errors. *Fertil Steril*. 2014 Aug;102(2):394–8.
230. Morin SJ, Patounakis G, Juneau CR, Neal SA, Scott RT, Seli E. Diminished ovarian reserve and poor response to stimulation in patients <38 years old: a quantitative but not qualitative reduction in performance. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2018 Aug 1;33(8):1489–98.
231. Lebovitz O, Haas J, Mor N, Zilberberg E, Aizer A, Kirshenbaum M i sur. Predicting IVF outcome in poor ovarian responders. *BMC Womens Health*. 2022 Dec;22(1):1–8.
232. Polyzos NP, Nwoye M, Corona R, Blockeel C, Stoop D, Haentjens P i sur. Live birth rates in Bologna poor responders treated with ovarian stimulation for IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2014 Apr;28(4):469–74.
233. Imudia AN, Awonuga AO, Doyle JO, Kaimal AJ, Wright DL, Toth TL i sur. Peak serum estradiol level during controlled ovarian hyperstimulation is associated with increased risk of small for gestational age and preeclampsia in singleton pregnancies after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2012 Jun;97(6):1374–9.

234. Ramezanali F, Arabipoor A, Hafezi M, Salman-Yazdi R, Zolfaghari Z, Asharfi M. Serum estradiol level on trigger day impacts clinical pregnancy rate in modified natural frozen embryo transfer cycles. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet.* 2019 Jun;145(3):312–8.
235. Wang Y, Xu X, Yang A min, Zhang J, Luo Z ye, Han Y i sur. Optimizing estradiol level for gonadotrophin-releasing hormone antagonist initiation among patients with simple tubal factor infertility. *Front Endocrinol.* 2022 Sep 9;13:915923.
236. Al-Inany HG, Youssef MA, Ayeleke RO, Brown J, Lam WS, Broekmans FJ. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Apr 29;4(4):CD001750.
237. Hamdine O, Broekmans FJ, Eijkemans MJC, Lambalk CB, Fauser BCJM, Laven JSE i sur. Early initiation of gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment results in a more stable endocrine milieu during the mid- and late-follicular phases: a randomized controlled trial comparing gonadotropin-releasing hormone antagonist initiation on cycle day 2 or 6. *Fertil Steril.* 2013 Sep;100(3):867–74.
238. Trounson AO, Calabrese R. Changes in plasma progesterone concentrations around the time of the luteinizing hormone surge in women superovulated for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984 Dec;59(6):1075–80.
239. Fleming R, Coutts JR. Induction of multiple follicular growth in normally menstruating women with endogenous gonadotropin suppression. *Fertil Steril.* 1986 Feb;45(2):226–30.
240. Macnamee MC, Howles CM, Edwards RG. Pregnancies after IVF when high tonic LH is reduced by long-term treatment with GnRH agonists. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1987 Oct;2(7):569–71.
241. Fulghesu AM, Angioni S, Belosi C, Apa R, Selvaggi L, Ciampelli M i sur. Pituitary-ovarian response to the gonadotrophin-releasing hormone-agonist test in anovulatory patients with polycystic ovary syndrome: predictive role of ovarian stroma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006 Sep;65(3):396–401.

242. Urbancsek J, Rabe T, Grunwald K, Kiesel L, Runnebaum B. Analysis of hormonal changes during combined busserelin/HMG treatment. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1990 Aug;5(6):675–81.
243. Fanchin R, Righini C, Olivennes F, de Ziegler D, Selva J, Frydman R. Premature progesterone elevation does not alter oocyte quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1996 Jun;65(6):1178–83.
244. Adda-Herzog E, Poulain M, de Ziegler D, Ayoubi JM, Fanchin R. Premature progesterone elevation in controlled ovarian stimulation: to make a long story short. *Fertil Steril.* 2018 Apr;109(4):563–70.
245. Koo HS, Cha SH, Kim HO, Song IO, Min EG, Yang KM i sur. A high response to controlled ovarian stimulation induces premature luteinization with a negative impact on pregnancy outcomes in a gonadotropin-releasing hormone antagonist cycle. *Clin Exp Reprod Med.* 2015 Dec;42(4):149–55.
246. Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Jenkins J i sur. Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2010 Aug;25(8):2092–100.
247. Al-Azemi M, Kyrou D, Kolibianakis EM, Humaidan P, Van Vaerenbergh I, Devroey P i sur. Elevated progesterone during ovarian stimulation for IVF. *Reprod Biomed Online.* 2012 Apr;24(4):381–8.
248. Silverberg KM, Martin M, Olive DL, Burns WN, Schenken RS. Elevated serum progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin administration in in vitro fertilization cycles do not adversely affect embryo quality. *Fertil Steril.* 1994 Mar;61(3):508–13.
249. Hill MJ, Royster GD, Healy MW, Richter KS, Levy G, DeCherney AH i sur. Are good patient and embryo characteristics protective against the negative effect of elevated progesterone level on the day of oocyte maturation? *Fertil Steril.* 2015 Jun;103(6):1477-1484.e1-5.

250. Hill MJ, Healy MW, Richter KS, Parikh T, Devine K, DeCherney AH i sur. Defining thresholds for abnormal premature progesterone levels during ovarian stimulation for assisted reproduction technologies. *Fertil Steril*. 2018 Sep;110(4):671-679.e2.
251. Oktem O, Akin N, Bildik G, Yakin K, Alper E, Balaban B i sur. FSH Stimulation promotes progesterone synthesis and output from human granulosa cells without luteinization. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2017 Mar 1;32(3):643–52.
252. Werner MD, Forman EJ, Hong KH, Franasiak JM, Molinaro TA, Scott RT. Defining the ‘sweet spot’ for administered luteinizing hormone-to-follicle-stimulating hormone gonadotropin ratios during ovarian stimulation to protect against a clinically significant late follicular increase in progesterone: an analysis of 10,280 first in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2014 Nov;102(5):1312–7.
253. Venetis CA, Kolibianakis EM, Bosdou JK, Lainas GT, Sfontouris IA, Tarlatzis BC i sur. Estimating the net effect of progesterone elevation on the day of hCG on live birth rates after IVF: a cohort analysis of 3296 IVF cycles. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2015 Mar;30(3):684–91.
254. Papaleo E, Corti L, Vanni VS, Pagliardini L, Ottolina J, De Michele F i sur. Basal progesterone level as the main determinant of progesterone elevation on the day of hCG triggering in controlled ovarian stimulation cycles. *Arch Gynecol Obstet*. 2014 Jul;290(1):169–76.
255. Venetis CA, Kolibianakis EM, Bosdou JK, Tarlatzis BC. Progesterone elevation and probability of pregnancy after IVF: a systematic review and meta-analysis of over 60 000 cycles. *Hum Reprod Update*. 2013 Oct;19(5):433–57.
256. Van Vaerenbergh I, Fatemi HM, Blockeel C, Van Lommel L, In’t Veld P, Schuit F i sur. Progesterone rise on HCG day in GnRH antagonist/rFSH stimulated cycles affects endometrial gene expression. *Reprod Biomed Online*. 2011 Mar;22(3):263–71.
257. Bila J, Dotlic J, Radjenovic SS, Vidakovic S, Tulic L, Micic J i sur. Predictive Value of Basal Serum Progesterone for Successful IVF in Endometriosis Patients: The Need for a Personalized Approach. *J Pers Med*. 2022 Oct 3;12(10):1639.



258. Sims JA, Seltman HJ, Muasher SJ. Early follicular rise of serum progesterone concentration in response to a flare-up effect of gonadotrophin-releasing hormone agonist impairs follicular recruitment for in-vitro fertilization. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1994 Feb;9(2):235–40.
259. Tang Y, Gong F, Lin G, Lu G. Early follicular progesterone concentrations and in vitro fertilization pregnancy outcomes. *Fertil Steril.* 2007 Apr;87(4):991–4.
260. Blockeel C, Baumgarten M, De Vos M, Verheyen G, Devroey P. Administration of GnRH antagonists in case of elevated progesterone at initiation of the cycle: a prospective cohort study. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011 Mar 1;12(3):423–8.
261. Hamdine O, Macklon NS, Eijkemans MJC, Laven JSE, Cohlen BJ, Verhoeff A i sur. Elevated early follicular progesterone levels and in vitro fertilization outcomes: a prospective intervention study and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2014 Aug;102(2):448-454.e1.
262. Kolibianakis EM, Zikopoulos K, Smitz J, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem AC i sur. Elevated progesterone at initiation of stimulation is associated with a lower ongoing pregnancy rate after IVF using GnRH antagonists. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2004 Jul;19(7):1525–9.
263. Mutlu MF, Erdem M, Mutlu I, Bulut B, Erdem A. Elevated basal progesterone levels are associated with increased preovulatory progesterone rise but not with higher pregnancy rates in ICSI cycles with GnRH antagonists. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017 Sep;216:46–50.
264. Faulisi S, Reschini M, Borroni R, Paffoni A, Busnelli A, Somigliana E. Clinical Value of Basal Serum Progesterone Prior to Initiate Ovarian Hyper-Stimulation with GnRH Antagonists: A Retrospective Cohort Study. *Gynecol Obstet Invest.* 2017;82(2):175–80.
265. Santos-Ribeiro S, Polyzos NP, Haentjens P, Smitz J, Camus M, Tournaye H i sur. Live birth rates after IVF are reduced by both low and high progesterone levels on the day of human chorionic gonadotrophin administration. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2014 Aug;29(8):1698–705.

266. Arvis P, Leher P, Guivarc'h-Levêque A. Both high and low HCG day progesterone concentrations negatively affect live birth rates in IVF/ICSI cycles. *Reprod Biomed Online*. 2019 Nov;39(5):852–9.
267. Beckers NGM, Macklon NS, Eijkemans MJC, Fauser BCJM. Women with regular menstrual cycles and a poor response to ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization exhibit follicular phase characteristics suggestive of ovarian aging. *Fertil Steril*. 2002 Aug;78(2):291–7.
268. Xu B, Li Z, Zhang H, Jin L, Li Y, Ai J i sur. Serum progesterone level effects on the outcome of in vitro fertilization in patients with different ovarian response: an analysis of more than 10,000 cycles. *Fertil Steril*. 2012 Jun;97(6):1321-1327.e1-4.
269. Acharya KS, Acharya CR, Bishop K, Harris B, Raburn D, Muasher SJ. Freezing of all embryos in in vitro fertilization is beneficial in high responders, but not intermediate and low responders: an analysis of 82,935 cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology registry. *Fertil Steril*. 2018 Oct;110(5):880–7.
270. Overview. Fertility problems: assessment and treatment. Guidance. NICE [Internet]. NICE;2013 [pristupljeno 06.06.2023]. Dostupno na: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg156>
271. Sugimoto K, Hashimoto T, Takahashi E, Saito Y, Haino T, Sasaki H i sur. Cancellation of in vitro fertilization treatment cycles predicts treatment outcome in female infertility patients aged 40 years or older. *Reprod Med Biol*. 2011 May 19;10(3):179–84.
272. Mohamed KA, Davies W a. R, Allsopp J, Lashen H. Agonist ‘flare-up’ versus antagonist in the management of poor responders undergoing in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril*. 2005 Feb;83(2):331–5.
273. Ben-Rafael Z, Orvieto R, Feldberg D. The poor-responder patient in an in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) program. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2009 Jul 7 [pristupljeno 06.06.2023.]. Dostupno na: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/09513599409023632>
274. Lamazou F, Fuchs F, Grynberg M, Gallot V, Herzog E, Fanchin R i sur. Cancellation of IVF-ET cycles: poor prognosis, poor responder, or variability of the response to

controlled ovarian hyperstimulation? An analysis of 142 cancellations. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2012 Feb;41(1):41–7.

## 11. ŽIVOTOPIS

Iva Pitner rođena je u Varaždinu 1988. godine gdje je završila osnovnu školu i opću gimnaziju. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2006. godine i na istom je diplomirala 2012. godine. Pripravnički staž odradila je u Klinici za dječje bolesti Zagreb i u KBC-u Sestre milosrdnice te je 2013. godine položila stručni ispit i dobila licencu za samostalan rad. U periodu od 2014. do 2015. godine radila je kao liječnik opće medicine Na Zavodu za hitnu medicinu Zadarske županije, ispostava Pag. Specijalizaciju iz ginekologije i opstetricije u Klinici za ženske bolesti i porodništvo KBC-a Sestre milosrdnice započela je 2015. godine pod mentorstvom prof. dr. sc. Krunoslava Kune te je položila specijalistički ispit 2020. godine i stekla titulu specijalistice ginekologije i porodništva. U sklopu specijalizacije je završila poslijediplomski specijalistički studij Ginekologija i opstetricija. Znanstveni poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu u Zagrebu upisala je 2017. godine. Završila je nekoliko tečajeva trajnog usavršavanja, autor je i koautor na nekoliko radova objavljenih u indeksiranim publikacijama i aktivno sudjeluje na znanstvenim skupovima.