

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Emina Ejubović

**Povezanost koncentracije
preovulacijskoga i postovulacijskoga
progesterona u serumu i ishoda
izvantjelesne oplodnje**

DISERTACIJA



Zagreb, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Emina Ejubović

**Povezanost koncentracije
preovulacijskoga i postovulacijskoga
progesterona u serumu i ishoda
izvantjelesne oplodnje**

DISERTACIJA

Zagreb, 2018.

Disertacija je izrađena u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Miro Kasum

POSVETA

Ovaj doktorat, s puno ljubavi i iskrene zahvalnosti, posvećujem svojim roditeljima Emiri i Nedžad, te bratu Maliku, čija mi je podrška u svakom trenutku i u svakom pogledu davala dodatnu snagu da u ovome poslu istrajem do kraja.

Isto tako ovaj doktorat, s iznimnim štovanjem i uvažavanjem, posvećujem dragoj prijateljici mr. sc. dr. Mirjani Bišćan, bez koje ove priče vjerojatno ne bi ni bilo, barem ne u ovom obliku.

ZAHVALE

Prof. dr. sc. Miri Kasumu, mom mentoru, na stvaranju poticajnog ozračja, nesebičnim sugestijama, korisnim savjetima i kvalitetnom stručnom vodstvu, što je neprestano popravljalo retke ovog rada i učinilo da danas ovako izgleda.

Stručnom povjerenstvu sastavljenom od vrsnih znalaca ginekološke endokrinologije, prof. dr. sc. Dinki Pavičić-Baldani, prof. dr. sc. Velimiru Šimuniću i prof. dr. sc. Krunoslavu Kuni, koji su svojim znanjem, opaskama i naputcima pridonijeli poboljšanju kvalitete ovog rada.

Prof. dr. sc. Slavku Oreškoviću, predstojniku Klinike za ženske bolesti i porode Petrova, KBC Zagreb, koji je svojim autoritetom uvijek, kada je bilo potrebno, bio uz mene i omogućio mi nesmetano prikupljanje podataka u Ustanovi na čijem je čelu.

Dr. sc. Josipu Jurasu na iznimno velikoj pomoći oko statističke obrade prikupljenih podataka.

Petri Gverić Katana, prof. na lektoriranju rukopisa doktorata.

Dr. sc. Patriku Staniću, embriologu, na pomoći pri angažiranju ispitanica za ovo istraživanje.

Medicinskim sestrama Ireni, Jasni i Brigiti sa Klinike za ženske bolesti i porode Petrova, KBC Zagreb na tehničkoj pomoći pri radu s ispitanicama.

Istraživanje je registrirano u Registru kliničkih istraživanja Australije i Novog Zelanda
(ANZCTR) na web stranici www.anzctr.org.au

Identifikacijski broj istraživanja: ACTRN12615001315505

SADRŽAJ

I. Kratice	iii
II. Popis tablica, slika i grafikona	vi
1. Uvod	1
1.1. Definicija neplodnosti	1
1.2. Epidemiologija i uzroci neplodnosti kod pacijentica u postupku izvantjelesne oplodnje.....	1
1.2.1. Epidemiologija neplodnosti.....	1
1.2.2. Uzroci neplodnosti.....	2
1.3. Menstruacijski ciklus i ovulacija	4
1.3.1. Hipotalamus i hipofiza	5
1.3.2. Endokrinologija menstruacijskoga ciklusa.....	8
1.3.3. Faze menstruacijskoga ciklusa	15
1.4. Stimulacijski protokoli	18
1.4.1. Gonadotropini.....	19
1.4.2. GnRH agonisti	19
1.4.3. GnRH-a u luteinskoj fazi.....	20
1.4.4. "STOP" GnRH-a protokol.....	20
1.4.5. Učinak GnRH-a na sintezu FSH i LH („Flare up“ protokol)	21
1.4.6. Učinak GnRH-a na sintezu FSH i LH s malim dozama agonista.....	21
1.4.7. Kratki protokol	22
1.4.8. Protokol s GnRH antagonistima (GnRH-ant).....	23
1.5. Povišen preovulacijski progesteron i utjecaj na ishod trudnoće nakon postupka izvantjelesne oplodnje	24
1.6. Strategije za prevenciju nepovoljnog djelovanja preovulacijskoga progesterona.....	26
1.6.1. Blagi stimulacijski protokoli	26

1.6.2. Ranija primjena preovulacijskoga hCG-a	26
1.6.3. Transfer zametaka 5. dana.....	27
1.6.4. Elekcijska krioprezervacija zametaka i odloženi transfer u prirodnome ciklusu	28
1.7. Postovulacijski progesteron i lutealna potpora u postupku izvantjelesne oplodnje	28
2. Hipoteza.....	30
3. Ciljevi rada	30
3.1. Opći cilj	30
3.2. Specifični ciljevi.....	30
4. Ispitanice i metode.....	32
4.1. Opis istraživanja	32
4.2. Statistička obrada podataka	37
5. Rezultati.....	39
6. Rasprava	60
7. Zaključak	71
8. Sažetak.....	73
9. Summary.....	74
10. Popis literature.....	75
11. Kratak životopis.....	90

I. KRATICE

ANZCTR -	<i>Australian New Zealand Clinical Trials Registry</i> (Registar kliničkih istraživanja Australije i Novog Zelanda)
SZO -	Svjetska zdravstvena organizacija
MPO -	Medicinski pomognuta oplodnja
IVF -	<i>In vitro fertilization</i> (izvantjelesna oplodnja)
GnRH -	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i> (gonadotropin oslobađajući hormon)
FSH -	Folikulostimulirajući hormon
rFSH -	Rekombinantni folikulostimulirajući hormon
LH -	Luteinizirajući hormon
E1 -	Estron
E2 -	Estradiol
E3 -	Estriol
P4 -	Progesteron
SŽS -	Središnji živčani sustav
TSH -	Tireostimulirajući hormon
CRH -	<i>Corticotropin-releasing hormone</i> (kortikotropin oslobađajući hormon)
GHRH -	<i>Growth hormone-releasing hormone</i> (oslobađajući hormon hormona rasta)
SO -	Supraoptička jezgra hipotalamusa
SC -	Suprakijazmatička jezgra hipotalamusa
PV -	Paraventrikularna jezgra hipotalamusa
DM -	Dorzomedijalna jezgra hipotalamusa
VM -	Ventromedijalna jezgra hipotalamusa
PH -	Stražnja hipotalamička jezgra
PM -	Premamilarna jezgra hipotalamusa
LM -	Lateralna mamilarna jezgra hipotalamusa

MM -	Medijalna mamilarna jezgra hipotalamusa
ACTH -	<i>Adrenocorticotropic hormone</i> (adrenokortikotropni hormon)
GH -	<i>Growth hormone</i> (hormon rasta)
ADH -	Antidiuretski hormon
GPCR -	<i>G-protein-coupled receptor</i> (G-protein receptor)
hCG -	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i> (humani korionski gonadotropin)
AMH -	<i>Anti-Müllerian hormone</i> (Anti-Müllerov hormon)
TGF- β -	<i>Transforming growth factor beta</i> (transformirajući čimbenik rasta beta)
PCOS -	<i>Polycystic ovary syndrome</i> (sindrom policističnih jajnika)
SHBG -	<i>Sex hormone binding globulin</i> (globulin koji veže spolne hormone)
ER- α -	estrogen receptor alfa
ER- β -	estrogen receptor beta
PR -	progesteronski receptor
DHEA -	<i>Dehydroepiandrosterone</i> (dehidroepiandrosteron)
3 β HSD -	<i>3β-Hydroxysteroid dehydrogenase</i> (3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza)
mRNA -	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (informacijska ribonukleinska kiselina)
LDL -	<i>Low-density lipoprotein</i> (lipoproteini niskog stupnja gustoće)
cAMP -	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (ciklički adenzin monofosfat)
StAR -	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i> (steroidogenički akutni regulatorni protein)
IGF-1 -	<i>Insulin-like growth factor 1</i> (čimbenik rasta poput inzulina 1)
OHSS -	<i>Ovarian hyperstimulation syndrome</i> (sindrom hiperstimulacije jajnika)
COH -	<i>Controlled ovarian hyperstimulation</i> (kontrolirana ovarijska hiperstimulacija)
hMG -	<i>Human menopausal gonadotropin</i> (humani menopauzalni gonadotropin)
ICSI -	<i>Intracytoplasmic sperm injection</i> (intracitoplazmatska injekcija spermija)
OK -	Oralni kontraceptivi

ET -	<i>Embryo transfer</i> (transfer zametka)
CC -	<i>Clomiphene Citrate</i> (klomifen-citrat)
IUI -	<i>Intrauterine insemination</i> (intrauterina inseminacija)
ITM -	Indeks tjelesne mase
AFC -	<i>Antral follicle count</i> (broj antralnih folikula)
UZV -	Ultrazvuk
PISCI -	ICSI metoda u kojoj se odabire sperma kroz vezivanje zrele sperme na sloj hijaluronske kiseline
IMSI -	<i>Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection</i> (intracitoplazmatska injekcija morfološki odabranih spermija)
BET -	<i>Blastocyst embryo transfer</i> (transfer blastocista)
FET -	<i>Frozen embryo transfer</i> (transfer krioprezerviranih zametaka)
CI -	<i>Confidence interval</i> (interval povjerenja)

II. POPIS TABLICA, SLIKA I GRAFIKONA

Tablica 1.	Životna dob ispitanica kontrolne i ispitivane skupine	39
Tablica 2.	Indeks tjelesne mase kod ispitanica kontrolne i ispitivane skupine.....	40
Tablica 3.	Doza gonadotropina u kontrolnoj i ispitivanoj skupini ispitanica.....	40
Tablica 4.	Koncentracija E2 i P4 kod ispitanica kontrolne i ispitivane skupine.....	41
Tablica 5.	Broj aspiriranih jajnih stanica, broj oplodjenih jajnih stanica i broj transferiranih zametaka kod ispitanica kontrolne i ispitivane skupine.....	42
Tablica 6.	Omjer koncentracija P4/E2 na dan primjene hCG-a i omjer koncentracije P4 na dan primjene hCG-a/broj aspiriranih jajnih stanica kod svih ispitanica.	46
Tablica 7.	Stopa zanošenja kod ispitanica kontrolne i ispitivane skupine.....	46
Tablica 8.	Klinička stopa trudnoća kod ispitanica kontrolne i ispitivane skupine.....	47
Tablica 9.	Životna dob kod ispitanica ispitivane skupine.....	47
Tablica 10.	Indeks tjelesne mase kod ispitanica ispitivane skupine.....	48
Tablica 11.	Primijenjena doza gonadotropina kod ispitanica ispitivane skupine.....	48
Tablica 12.	Koncentracija E2 i P4 kod ispitanica ispitivane skupine.....	49
Tablica 13.	Broj aspiriranih jajnih stanica, broj oplodjenih jajnih stanica i broj transferiranih zametaka kod ispitanica ispitivane skupine.....	50
Tablica 14.	Omjer koncentracije P4/E2 na dan primjene hCG-a i omjer koncentracije P4 na dan primjene hCG-a/broj aspiriranih jajnih stanica kod ispitanica ispitivane skupine.....	51
Tablica 15.	Stopa zanošenja kod ispitanica ispitivane skupine.....	51
Tablica 16.	Klinička stopa trudnoća kod ispitanica ispitivane skupine.....	52
Tablica 17.	Vrsta transfera kod ispitanica ispitivane skupine.....	52
Tablica 18.	Stopa zanošenja kod ispitanica u ispitivanoj skupini s obzirom na vrstu transfera zametaka.....	53
Tablica 19.	Klinička stopa trudnoća u ispitivanoj skupini s obzirom na vrstu transfera.	53
Tablica 20.	Stopa zanošenja u skupini <i>normal respondera</i> s obzirom na vrstu transfera..	54
Tablica 21.	Klinička stopa trudnoća u skupini <i>normal respondera</i> s obzirom na vrstu transfera	54
Tablica 22.	Stopa zanošenja u skupini <i>high respondera</i> s obzirom na vrstu transfera...	55
Tablica 23.	Klinička stopa trudnoća u skupini <i>high repondera</i> s obzirom na vrstu	

	transfera.....	55
Tablica 24.	Utjecaj P4 5. dana na ishod izvantjelesne oplodnje kod svih ispitanica.....	56
Tablica 25.	Utjecaj koncentracije P4 5. dana na stopu zanošenja kod ispitanica kontrolne skupine.....	57
Tablica 26.	Utjecaj koncentracije P4 5. dana na kliničku stopu trudnoća kod ispitanica kontrolne skupine.....	57
Tablica 27.	Utjecaj koncentracije P4 5. dana na stopu zanošenja kod ispitanica ispitivane skupine.....	57
Tablica 28.	Relativni rizik koncentracije P4 5.dana >384,6 nmol/L za stopu zanošenja kod ispitanica ispitivane skupine.....	58
Tablica 29.	Utjecaj koncentracije P4 5. dana ciklusa na kliničku stopu trudnoća kod ispitanica ispitivane skupine.....	59
Slika 1.	Prikaz hipotalamusa, hipofize, <i>sella turcica</i> i portalnoga krvotoka.....	6
Slika 2.	Prikaz osovine hipotalamus-hipofiza-jajnik.....	8
Slika 3.	Dvostanična teorija jajnika.....	11
Slika 4.	Shematski prikaz $\Delta(\text{delta})^5$ i $\Delta(\text{delta})^4$ puta u nastanku spolnih hormona...	14
Slika 5.	Hormonske promjene tijekom menstruacijskoga ciklusa.....	17
Slika 6.	Sheme različitih stimulacijskih protokola.....	23
Slika 7.	Intracitoplazmatska injekcija spermija. Mikromanipulator učvršćuje jajnu stanicu (lijevo), a kontralateralno je mikropipeta s vidljivom glavom spermija, krajnje desno.....	34
Slika 8.	Intracitoplazmatska injekcija spermija. Mikropipeta penetrira u jajnu stanicu, uvija se oolema, tik prije prsnuća. Glava spermija vidljiva na vrhu mikropipete.....	35
Slika 9.	Dvostanični zametak s blastomerama jednake veličine, gdje svaka blastomera sadržava po jednu jezgru.....	36
Slika 10.	Osmostanični zametak s blastomerama jednake veličine i bez vidljivih jezgara.....	36
Grafikon 1.	Povezanost koncentracije P4 na dan hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica kod svih ispitanica.....	43

Grafikon 2.	Povezanost koncentracije P4 na dan hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica kod ispitanica ispitivane skupine.....	44
Grafikon 3.	Povezanost koncentracije P4 5. dana ciklusa i broja aspiriranih jajnih stanica kod svih ispitanica.....	45
Grafikon 4.	Utjecaj koncentracije P4 5. dana na ishod izvantjelesne oplodnje kod svih ispitanica.....	56
Grafikon 5.	Utjecaj koncentracije P4 5. dana na stopu zanošenja kod ispitanica ispitivane skupine.....	58

1. UVOD

1.1. DEFINICIJA NEPLODNOSTI

U hrvatskome jeziku plodnost ili fertilitet se definira kao prosječan broj žive djece koje rodi žena tijekom svoje reproduktivne dobi (15-45 godina), dok je pojam neplodnosti i steriliteta izjednačen. *Primarni sterilitet* predstavlja stanje u kojemu kod para u reproduktivnoj dobi, pri redovitim i nezaštićenim spolnim odnosima tijekom godinu dana, ne dolazi do trudnoće. *Sekundarni sterilitet* predstavlja nemogućnost realiziranja trudnoće nakon bar jedne prethodne trudnoće. *Infertilitet* se, u hrvatskome jeziku, definira kao nemogućnost žene za rađanje živog i za život sposobnog djeteta. S druge strane, anglosaksonska literatura pojam *steriliteta* definira kao apsolutnu nemogućnost zanošenja, dok pojam *infertiliteta* odgovara hrvatskom shvaćanju pojma sterilitet. Hrvatski termin *neplodnost* etimološki odgovara infertilitetu, a uporabnim značenjem određuje sterilitet, koji se može podijeliti na *primarni* i *sekundarni*. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) definirala je neželjenu neplodnost kao bolest. *Umanjena plodnost ili subfertilitet* predstavlja stanje u reproduktivnoj dobi para kod kojega trudnoća nastupa poslije dužega razdoblja nego što je slučaj kod normalno plodnog para u kojega je prosječna mogućnost zanošenja po ciklusu (*fekundabilnost*) oko 20%. Fekunditet se definira kao vjerojatnost rađanja živoga djeteta po jednom menstrualnom ciklusu i iznosi oko 10%. (1, 2).

1.2. EPIDEMIOLOGIJA I UZROCI NEPLODNOSTI KOD PACIJENTICA U POSTUPKU IZVANTJELESNE OPLODNJE

1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA NEPLODNOSTI

Unatrag nekoliko desetljeća opaža se blago i trajno opadanje plodnosti, posebice u razvijenim zemljama svijeta. Od 1980. godine stopa neplodnosti je porasla za 4%, najčešće zbog odgađanja trudnoće do podmakle dobi kada je fiziološka fekundabilnost smanjena (3). Poseban problem u epidemiološkim istraživanjima u reproduktivnoj medicini predstavlja prevalencija subfertiliteta u općoj populaciji (4) s ciljem planiranja rutinskih istraživanja neplodnosti i pravodobnoga započinjanja tretmana u slučajevima slabije prognoze za

postizanje trudnoće (5). Nažalost, smanjena plodnost dovodi do narušavanja demografske ravnoteže, tako da se fertilitet u većini zapadnih zemalja kreće između 1,2 i 2, a u Hrvatskoj iznosi oko 1,34 (6). Danas u Europi žene u prosjeku rađaju prvo dijete 4 do 5 godina kasnije nego prije 20 godina, dok ih čak 20% prvu trudnoću ima tek nakon 35. godine. Žene u Hrvatskoj rađaju prvi put s 29,2 godine, 31% svih porođaja događa se između 30. i 35. godine, dok svega 14% žena ima 3 ili više djece. U Europi je, u odnosu na Hrvatsku, neplodnost češća za 5-7%, a fertilitet je umanjena za 0,4-0,7%. SZO navodi da je fekunditet najviši između 20. i 27. godine života te da iznosi oko 20-30% (7). Sveukupno, stopa fertiliteta je 4-8% niža kod žena između 25 i 29 godina starosti, 15-19% niža kod žena starosti između 30 i 34 godine, 26-46% kod žena između 35 i 39 godina i čak do 95% niža kod žena starosti između 40 i 45 godina (8). Stalan porast liječenja medicinski pomognutom oplodnjom (MPO), a koji iznosi 10% godišnje, također upućuje na umanjenu plodnost. Podatci za 2010. godinu pokazuju da je u svijetu obavljeno oko milijun postupaka izvantjelesne oplodnje (in vitro fertilizacija – IVF). U Hrvatskoj je neplodnost zabilježena kod oko 80 000 parova, dok se godišnje liječi 10-12 tisuća parova. Pojavnost neplodnosti porasla je za 5% u posljednjih 30 godina (7).

1.2.2. UZROCI NEPLODNOSTI

Razlozi neplodnosti u parova mogu biti višestruki, a mogu se podijeliti u dvije kategorije: medicinski čimbenici i nemedicinski čimbenici. Medicinskim čimbenicima pripadaju biološka i genetska obilježja jedinke, dok nemedicinske čimbenike čine socijalna i ekonomska situacija te moderni stavovi i svjetonazor. Nadalje, parovi se sve kasnije odlučuju na potomstvo, što također predstavlja jedan od glavnih čimbenika neplodnosti (8). U 50% slučajeva radi se o problemima kod žena, u 40% slučajeva problemi su zabilježeni kod muškaraca, dok su u oko 10% parova razlozi neplodnosti nejasni ili nedovoljno objašnjeni. Kod gotovo 30% parova razlozi su neplodnosti obostrani, dok je kod 40% parova razlog neplodnosti višestruk (9). Za praksu je važna sljedeća podjela razloga neplodnosti:

- neodgovarajuća proizvodnja i/ili transport sjemena u muškaraca (40%),
- neodgovarajuća proizvodnja jajne stanice u žene (25%),

- smetnje susretu gameta (oplodnji) te transportu i implantaciji zametka, što ovisi o stanju puta oplodnje (25%),
- nerazjašnjena neplodnost (10%).

Neodgovarajuća proizvodnja i/ili transpost sjemena u muškaraca može se podijeliti na pregerminalne, germinalne i postgerminalne. *Pregerminalni* uzroci su endokrinološkog podrijetla, a poremećaj se nalazi u središtu reproduktivske osovine (hipofiza). Posljedica je niska razina testosterona, što je uvjetovano niskom razinom gonadotropina. *Germinalni* uzroci neplodnosti kod muškaraca mogu biti kromosomske nepravilnosti, upale, različiti toksini, autoimuna oboljenja ili varikokela, a očituju se smanjenim brojem i kvalitetom sjemenih stanica. Smetnje pri transportu sjemena izvodnim putovima, kao i različiti poremećaji kvalitete i količine sjemene tekućine predstavljaju postgerminalne uzroke muške neplodnosti.

Neodgovarajuća proizvodnja jajne stanice u žene (sindrom izostale ovulacije ili kronična anovulacija) može nastati uslijed dviju različitih skupina razloga: središnjega neuroendokrinoga poremećaja te perifernih endokrinih smetnji. *Središnji neuroendokrini poremećaji* (hipofiza) mogu biti posljedica upale, traume ili tumora ovoga područja mozga, poremećaji uvjetovani tjelovježbom i prehranom, te neurofarmakološki i psihoneuroendokrini. Poremećaji štitne žlijezde i nadbubrežnih žlijezda, kao i patološka proizvodnja spolnih steroida u gonadama i njihovo ekstraplandularno lučenje pripadaju skupini *perifernih endokrinih poremećaja*.

Smetnje susretu gameta (oplodnji) te transportu i implantaciji zametka podrazumijevaju sve one poremećaje koji otežavaju implantaciju, prehranu i razvitak proembrija. Njima pripadaju različita mehanička i upalna oštećenja, neadekvatan tuboovarijski odnos, poremećena cervikalna sekrecija, poremećen transport zametka do maternice, bio on ubrzan, usporen ili spriječen, kao i nepovoljno lokalno stanje endometrija zbog upalnih ili endokrinih razloga. Oštećenja jajovoda mogu nastati uslijed različitih abdominalnih operacija, transcervikalnih manipulacija, endometrioze, namjerne sterilizacije ili zbog upala uzrokovanih spolno prenosivim bolestima (1). Upravo su upale najvažniji i najčešći etiološki čimbenik oštećenja i ožiljavanja jajovoda, iako se ovdje mogu ubrojiti i

neki imunološki uzroci neplodnosti. U literaturi se, od mikroorganizama koji dovode do oštećenja jajovoda i posljedično do neplodnosti, najčešće spominju *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoeae*, iako se i mikroorganizmi poput *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, kao i drugi mikrobiomi rodnice mogu dovesti u svezu s patologijom neplodnosti (10). Nova istraživanja pokazala su da postoji moguća veza oksidacijskoga stresa i neplodnosti zbog poremećene ravnoteže prooksidacijskih i antioksidacijskih mehanizama kod žena s perzistirajućom klamidijalnom infekcijom (11).

Nepotpuno objašnjena ili nerazjašnjena neplodnost predstavlja posebnu kategoriju uzroka neplodnosti. Obuhvaća heterogenu skupinu parova kod kojih ne dolazi do trudnoće iako su dokazani prohodnost jajovoda, ovulacija, fertilnost ejakulata, penetracija spermija kroz cervikalnu sluz te uredan endometrij. Mogući uzroci ovoga stanja uključuju različite prikrivene poremećaje spermija, varikokelu, endometrioze, poremećenu receptivnost endometrija, poremećaje folikulogeneze i endokrinoga statusa, disfunkciju cerviksa te nedovoljno razjašnjene imunološke reakcije (1). Postoje čvrsti dokazi koji sugeriraju da su promjene u endometriju povezane sa smanjenom plodnosti po ciklusu kao rezultat endometrioze. Patofiziologija neplodnosti kod endometrioze uključuje kroničnu upalu koja dovodi do neadekvatne receptivnosti endometrija čime uzrokuje i neplodnost i abnormalno krvarenje (12). Fokus suvremenih istraživanja neplodnosti jesu genska i molekularna zbivanja na razini endometrija kod žena s endometriozom i višekratnim neuspjesima postupaka izvantjelesne oplodnje (13, 14).

1.3. MENSTRUACIJSKI CIKLUS I OVULACIJA

Menstruacijski ciklus predstavlja sve prirodne promjene koje se zbivaju na ženskome reproduktivskom sustavu (posebice maternici i jajnicima), a koje omogućavaju trudnoću. Tijekom menstruacijskoga ciklusa produciraju se jajne stanice, a maternica se priprema za trudnoću (15). Zbog toga je i endokrinološka kontrola menstruacijskoga ciklusa, a posljedično i reproduktivskoga sustava vrlo složena. Menstruacijski ciklus odvija se na 3 razine:

- Hipotalamus i hipofiza – neuroendokrinologija,

- Jajnik – gametogeneza i stvaranje spolnih hormona,
- Maternica – promjene cerviksa i endometrija.

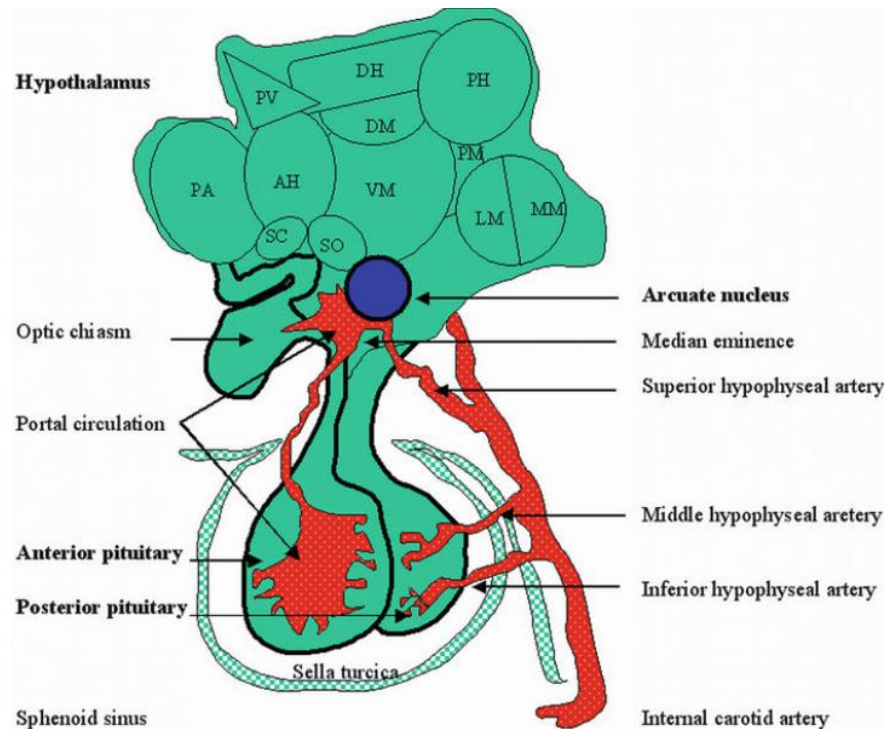
Ključni hormoni koji imaju ulogu u kontroli ciklusa jesu gonadotropin oslobađajući hormon (eng. *Gonadotropin-releasing hormone*-GnRH), folikulostimulirajući hormon (FSH), luteinizirajući hormon (LH), estradiol (E2) i progesteron (P4). Osim spomenutih hormona, mnogobrojni drugi organi i tkiva također sudjeluju u regulaciji menstruacijskoga ciklusa (štitna žlijezda, nadbubrežna žlijezda, masno tkivo i dr.), kao i mnogobrojni peptidi i nepeptidni hormoni (16).

1.3.1. HIPOTALAMUS I HIPOFIZA

Početni signal za menstruacijski ciklus dolazi iz središnjega živčanog sustava (SŽS). Najvažniju endokrinu ulogu u SŽS-u imaju **hipotalamus i hipofiza**. **Hipotalamus** predstavlja malen dio *diencephalona*, volumena 4 cm³, teži oko 10 g, i čini oko 0,3% cijeloga mozga. Nalazi se iznad spojnice očnoga živca i čini prednji dio lateralnog zida moždane komore. Sprijeda se pruža do *lamine terminalis*, straga do **pinealne žlijezde**, iznad do **subfornikalnoga organa**, a ispod do *eminentia mediana*. *Eminentia mediana* se preko *infundibuluma* nastavlja do **neurohipofize** (17). U njemu se nalaze mnogobrojne jezgre odgovorne za endokrinu regulaciju, reprodukciju, metabolizam, regulaciju tjelesne temperature, emocija i elektrolitske ravnoteže (Slika 1.) (18).

Hipotalamus ima 3 zone: lateralnu, medijalnu i periventrikularnu. Unutar svake zone nalazi se nekoliko jezgara, pri čemu *nucleus arcuatus* ima vrlo važnu ulogu u reprodukciji. *Nucleus arcuatus* odgovoran je za produkciju GnRH. GnRH se luči u portalnu hipofiznu cirkulaciju, dolazi do prednjeg režnja hipofize, gdje dovodi do lučenja FSH i LH. Hipotalamus također utječe na funkcioniranje štitne žlijezde preko tireostimulirajućega hormona (TSH), nadbubrežne žlijezde preko kortikotropin oslobađajućeg hormona (eng. *Cortikotropin-releasing hormone*-CRH) te na rast i metaboličku homeostazu preko oslobađajućeg hormona za hormon rasta (eng. *Growth hormone releasing hormone*-GHRH) (18).

Hipofiza je mala žlijezda veličine 12x8 mm i težine oko 500 mg i predstavlja glavnu žlijezdu endokrinoga sustava. Nalazi se ispod treće moždane komore i iznad *sfenoidalnoga sinusa* u predjelu *sella turcica*. Hipofiza odrasle osobe ima 2 glavna dijela: **adenohipofizu** i **neurohipofizu**. Neurohipofiza je diencefalični nastavak hipotalamusa, dok je adenohipofiza ektodermalni derivat stomatodeuma. Druga je podjela hipofize na prednji i stražnji režanj, pri čemu prednji režanj odgovara adenohipofizi, a stražnji odgovara neurohipofizi. Razlika između spomenute dvije nomenklature jest u tome što podjela hipofize na prednji i stražnji režanj ne uključuje infundibulum, koji se nastavlja od hipotalamusa prema hipofizi, a sadržava neuralne hipofizine sveze i nastavlja se do *eminentia mediana* (18).

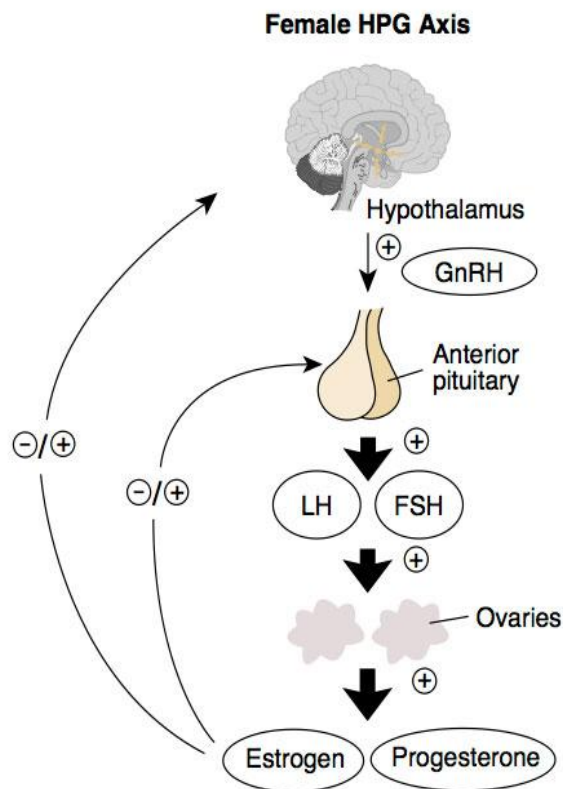


Slika 1. Prikaz hipotalamusa, hipofize, sella turcica i portalnoga krvotoka. Uz *nucleus arcuatus*, druga su jezgra hipotalamusa: *SO* - supraoptička jezgra, *SC* - suprakijazmatička jezgra, *PV* - paraventrikularna jezgra, *DM* - dorzomedijalna jezgra, *VM* - ventromedijalna jezgra, *PH* - stražnja hipotalamička jezgra, *PM* - premamilarna jezgra, *LM* - lateralna mamilarna jezgra, *MM* - medijalna mamilarna jezgra – s dopuštenjem autora (16)

Prednji režanj hipofize sadržava nekoliko različitih tipova stanica:

- gonadotropne stanice – odgovorne za lučenje FSH i LH,
- tireotropne stanice – odgovorne za lučenje TSH,
- adrenokortikotropne stanice – odgovorne za lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH),
- somatomotropne stanice – odgovorne za lučenje hormona rasta (GH),
- laktotropne stanice – odgovorne za lučenje prolaktina.

Osim spomenutih hormona, prednji režanj hipofize luči i aktivin, inhibin i folistatin koji imaju ulogu u regulaciji menstruacijskoga ciklusa. Stražnji režanj hipofize sadržava 2 tipa stanica koje luče antidiuretski hormon (ADH) i oksitocin. Komunikacija između hipotalamusa i prednjeg režnja hipofize vaskularna je, dok je veza između hipotalamusa i stražnjeg režnja hipofize neuronska (18). Na slici 2 prikazana je osovina hipotalamus-hipofiza-jajnik s glavnim hormonima koje luče.



Slika 2. Prikaz osovine hipotalamus-hipofiza-jajnik – s dopuštanjem autora (19)

1.3.2. ENDOKRINOLOGIJA MENSTRUACIJSKOGA CIKLUSA

GnRH je decapeptid koji se sintetizira u hipotalamusu. Prvi put je opisan 1970-ih godina, a GnRH neuroni mogu se otkriti u fetalnome hipotalamusu s 9-10 tjedana gestacije (20). Do sada je otkriveno 3 tipa GnRH kod ljudi (GnRH-I, GnRH-II i GnRH-III) (21). GnRH-I je klasični hormon hipotalamusa odgovoran za regulaciju, sintezu i lučenje FSH i LH (22). GnRH-II prvi put je opisan u moždanome tkivu, ali je otada njegova prisutnost dokazana i u drugim perifernim tkivima i organima, kao što su endometrij, dojka i jajnici (23). Prisutnost GnRH-III u neuronima hipotalamusa prvi put je opisana 1993. godine, ali je njegova uloga kod ljudi još uvijek nepoznata (21).

GnRH-I sintetizira se iz većeg prekursora koji sadržava 92 aminokiseline. Nakon sinteze, GnRH-I putuje prema *eminentia mediana* hipotalamusa i pulsatilno se luči u portalnu cirkulaciju. Životni vijek GnRH-I molekule vrlo je kratak, s vremenom poluživota od 2-4 minute. Zbog brza nestanka iz cirkulacije, vrijednosti GnRH-I u perifernoj cirkulaciji ne koreliraju sa stvarnom aktivnošću hipofize (16). GnRH-I djeluje na prednji režanj hipofize i dovodi do sinteze i pohranjivanja gonadotropina, pomicanja gonadotropina iz pohrane te do njihova lučenja. Da bi se ove aktivnosti odvijale adekvatno, neophodno je pulsatilno lučenje GnRH (16). Kontinuirana sekrecija GnRH dovela bi do supresije lučenja FSH i LH, kao i do supresije transkripcije FSH i LH gena u prednjem režnju hipofize (24).

GnRH-II razlikuje se od GnRH-I u 3 aminokiseline na pozicijama 5, 7 i 8 (25). Osim toga, GnRH-II uglavnom se nalazi izvan mozga, uključujući i u posteljici. Poput lučenja GnRH-I iz hipotalamusa, i GnRH-II luči se u posteljici pulsatilno (26). Pretpostavlja se da različiti čimbenici imaju ulogu u lučenju GnRH. Estrogen ima i pozitivan i negativan učinak na lučenje GnRH-I. Suprimira lučenje GnRH-I negativnom povratnom spregom (27), dok P4 ima stimulirajuću ulogu na GnRH-I mRNA (informacijska ribonukleinska kiselina) koja se može smanjiti RU48 antagonistom progesteronskoga receptora (28).

Međutim, unatoč činjenici da GnRH ima bitnu ulogu u kontroli reproduktivskih funkcija, nova istraživanja pokazala su da hipotalamični neuropeptid-kisspeptin predstavlja ključni regulator osovine hipotalamus-hipofiza-gonade, osovine koja ima glavnu ulogu u regulaciji GnRH neurona. Naime, kisspeptin izravno signalizira GnRH neuronima oslobađanje GnRH-a, koji potom stimulira lučenje FSH i LH (29).

Dva tipa GnRH receptora opisana su kod ljudi: GnRH-I receptor (GnRH-IR) i GnRH-II receptor (GnRH-IIR). GnRH-IR je transmembranski G-protein receptor (GPCR) (30), a osim u mozgu, može se naći i u posteljici, folikulima jajnika, miometriju, gušterači, jetrima, srcu, skeletnim mišićima, bubrezima i perifernoj krvi. GnRH-IIR je također GPCR i može se naći u hipofizi, posteljici, jajnicima, maternici, prostati, zreloj spermiji, gušterači, tankome i debelome crijevu, bubrezima i jetrima (16).

Analozi GnRH razvijeni su promjenama aminokiselinske sekvence GnRH molekule. Ove promjene rezultiraju promjenama u vremenu poluživota GnRH, kao i u njegovoj biološkoj aktivnosti. Postoje 2 glavna tipa GnRH analoga: GnRH agonisti i GnRH antagonisti. Kod uporabe GnRH agonista, kontinuirana aktivacija GnRH receptora dovodi do desenzitizacije uslijed konformacijske promjene receptora, odvajanja od G proteina, internalizacije receptora te do reducirane sinteze receptora. Prije desenzitizacije GnRH agonistima dolazi do povećane sekrecije gonadotropina, a desenzitizacija nastupa 7-14 dana poslije (16). Za razliku od agonista, GnRH antagonisti dovode do trenutačne supresije lučenja gonadotropina, koja je brza i reverzibilna (31). GnRH analozi koriste se u tretiranju mnogobrojnih reproduktivnih poremećaja, kao što su prerani pubertet, endometrioza, leiomiomi maternice, a u uporabi su i u postupcima izvantjelesne oplodnje (IVF-a) (32).

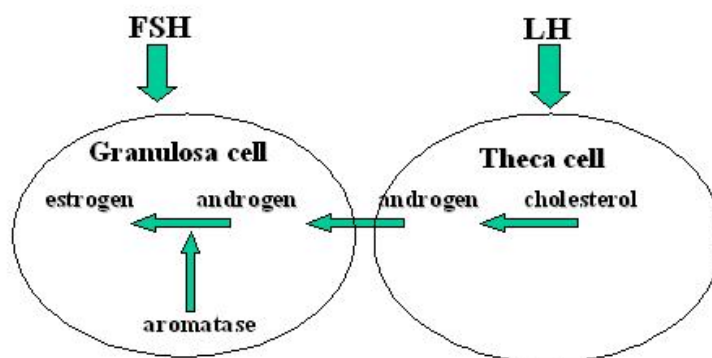
FSH je glikoproteinski dimer koji se sastoji od 2 podjedinica: α (alfa) i β (beta). Alfa podjedinica nalazi se i u FSH i u LH, kao i u TSH i hCG. Beta podjedinica je različita i hormon-specifična, što omogućuje diferencijalnu funkciju svakoga hormona. Alfa podjedinica se sastoji od 92 aminokiseline, dok se beta podjedinica sastoji od 118 aminokiselina i 5 ostataka sijalične kiseline. Ostaci sijalične kiseline odgovorni su za poluživot hormona tako da, gdje je njihov sadržaj veći, dulji je poluživot molekule. FSH ima poluživot od nekoliko sati, a dodatak sijalične kiseline rekombiniranom ili iz urina dobijenom FSH produljuje njegov poluživot (16). FSH raste nekoliko dana prije početka menstruacije i odgovoran je za regrutiranje kohorte folikula, kao i za selekciju dominantnog folikula. Inducira rast granulosa stanica i aktivira aromatazu, koja konvertira androgene u estrogene. Nakon toga, vrijednosti FSH počinju opadati uslijed proizvodnje estrogena i inhibina B od strane rastućih folikularnih granulosa stanica. Unatoč padu vrijednosti FSH, dominantni folikul nastavlja rasti zbog toga što stječe najveću koncentraciju FSH receptora, čime postaje otporniji na pad FSH. Nakon ovulacije dominantnog folikula, vrijednost FSH pada (16).

LH je glikoproteinski dimer koji se također sastoji od 2 podjedinica: α (alfa) i β (beta). Beta podjedinica LH sastoji se od 121 aminokiseline i 2 ostatka sijalične kiseline, zbog čega ima kraće vrijeme poluživota, oko 20 minuta. Upravo zbog kratka vremena poluživota, LH se mora brzo sintetizirati i tipično se luči s amplitudom koja je viša nego kod FSH. Poput FSH, i LH počinje rasti prije početka menstruacije, ali je porast LH tijekom folikularne faze

menstruacijskoga ciklusa postupan. Neposredno prije ovulacije vrijednost LH raste kao odgovor na proizvodnju E2 od strane dominantnog folikula zahvaljujući pozitivnoj povratnoj sprezi. Tijekom sekrecijske faze ciklusa, vrijednost LH pada (16).

FSH i LH receptori pripadaju obitelji GPCR receptora. FSH receptori nalaze se isključivo na membrani granuloza stanica, dok se LH receptori nalaze na membrani teka stanica. U prisutnosti E2, FSH inducira LH receptore na granuloza stanicama. Aktivnost LH receptora primarno stimulira proizvodnju androstendiona od strane teka stanica koji se, potom, transportira do granuloza stanica, aromatizira u estron i u konačnici transformira u E2. Ovo predstavlja osnovu dvostanične teorije jajnika (Slika 3.) (16).

Figure 3



Slika 3. Dvostanična teorija jajnika – s dopuštenjem autora (33)

Peptidni hormoni jajnika, kao što su inhibin, aktivin i Anti-Müllerov hormon (AMH) imaju također ulogu u menstruacijskome ciklusu tako što modeliraju lučenje hormona iz SŽS-a. Inhibin, aktivin i AMH pripadaju obitelji liganada transformirajućeg čibenika rasta beta (TGF- β).

Inhibin je polipeptid koji uglavnom luče granuloza stanice, ali se može pronaći i u gonadotropinima hipofize (34). Sastoji se od α (alfa) i β (beta) podjedinice. Identificirane su 2 forme inhibina: inhibin-A i inhibin-B, pri čemu svaki od njih ima identičnu alfa podjedinicu i specifičnu beta podjedinicu. Inhibin-A se dominantno luči tijekom luteinske faze menstruacijskoga ciklusa, dok se inhibin-B dominantno luči tijekom folikularne faze.

Granuloza stanice, kao odgovor na FSH, luče inhibin koji selektivno sprječava lučenje FSH iz prednjeg režnja hipofize, čineći na taj način negativnu povratnu spregu (16).

Aktivin, koji također luče granuloza stanice, povećava lučenje FSH povećanjem broja GnRH receptora. Učinak aktivina blokiraju inhibin i folistatin (16).

Folistatin je peptid koji luče gonadotropi hipofize. Inhibira sintezu i sekreciju FSH preko sekvenciranja aktivina. Inhibin sprječava proizvodnju folistatina, dok aktivin stimulira njegovu proizvodnju (35).

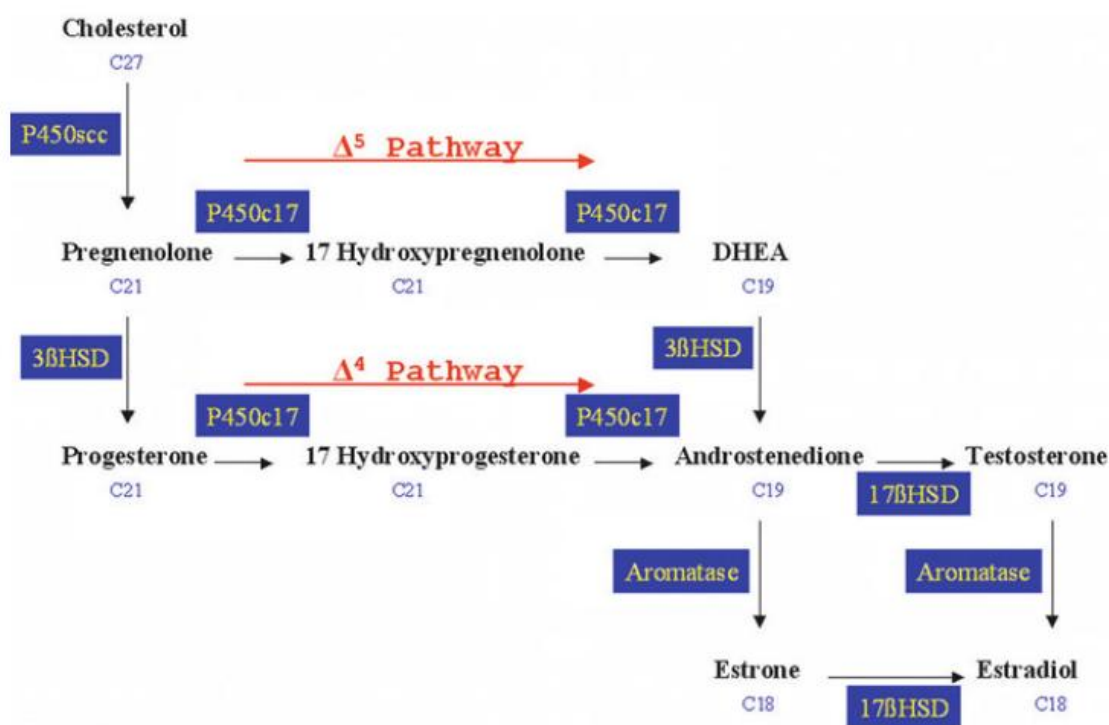
AMH je proizvod granuloza stanica malih antralnih i preantralnih folikula i predstavlja mjeru njihove kvantitete, odnosno, mjeru pričuve jajnika. AMH, kroz parakrini učinak na jajnik, inhibira FSH-posredovani rast folikula i na taj način doprinosi odabiru dominantnog folikula (8). Klinički, AMH se koristi kao prediktor pričuve jajnika kod pacijentica koje se podvrgavaju postupcima izvantjelesne oplodnje zbog neplodnosti. Vrijednosti AMH povišene su kod pacijentica sa sindromom policističnih jajnika (PCOS), a smanjene kod žena koje koriste antineoplastične lijekove (16).

Estrogeni su grupa steroidnih hormona koji uključuju estron (E1), estradiol (E2) i estriol (E3). Najpotentniji estrogen je **estradiol (E2)**, koji je proizvod jajnika. E1 nastaje uglavnom perifernom konverzijom androstendiona, a djelomično nastaje i u jetrima konverzijom E2 preko 17(beta)-hidroksisteroid dehidrogenaze, dok je E3 glavni estrogen koji sintetizira posteljica tijekom trudnoće. Vrijednosti E2 u serumu rastu tijekom folikularne faze menstrualnog ciklusa i proporcionalne su rastu folikula. E2 se u krvi nalazi vezan za proteinske nosače, pri čemu albumini nose oko 60% E2, SHBG (eng. *Sex hormone binding globulin* – globulin koji veže spolne hormone) veže 38% E2, dok je 2% E2 slobodno u cirkulaciji. Ovaj slobodni hormon je aktivan i može doći do ciljnih stanica. Tijekom rane folikularne faze vrijednosti E2 ne prelaze 50 pg/mL, a na vrhuncu rasta folikula vrijednosti E2 su oko 200-250 pg/mL. Ovulacijom vrijednosti E2 padaju, ali se drugi porast bilježi sredinom luteinske faze uslijed sekrecije estrogena od strane žutoga tijela. Cirkulirajući estrogeni konjugiraju se u jetrima i formiraju sulfate i glukoronide; 80% se eliminira iz organizma preko urina, a preostalih 20% preko bilijarnoga trakta (16).

Poznata su 2 estrogenska receptora: estrogen receptor alfa (ER- α) i estrogen receptor beta (ER- β) (36). Estrogen ulazi u svaku stanicu, ali će na njega odgovoriti samo one stanice koje imaju receptore. Receptor je obično lokaliziran u jezgri stanice, ali katkad može dospjeti i u citoplazmu (8). Jednom kada je estrogen vezan za svoj receptor, počinje aktivacija genske transkripcije. Poznato je da E2 ima negativan učinak na lučenje FSH. Ovaj negativni učinak izravna je posljedica vezanja E2 za receptor, čime se sprječava transkripcija beta podjedinice FSH (16).

Progesteron (P4) je, poput estrogena, steroidni hormon i glavni je steroid žutoga tijela. Tijekom folikularne faze njegove vrijednosti su obično $<6,36$ nmol/L, a svoj vrhunac doseže sredinom luteinske faze, kada njegove vrijednosti prelaze 15,9 nmol/L. Najveći dio P4 u cirkulaciji je vezan za albumine (80%) i kortikosteroidni-vezujući globulin (18%), dok je vrlo malen dio P4 vezan za SHBG (0,5%). Ostatak P4 je slobodan u cirkulaciji. U jetrima se P4 uklanja iz cirkulacije preko njegove konverzije u pregnandiol, koji se potom konjugira sa glukuronskom kiselinom i eliminira urinom (16). Postoji nekoliko progesteronskih receptora: progesteronski receptor-A (PR-A), progesteronski receptor-B (PR-B) i progesteronski receptor-C (PR-C). PR-B je pozitivni regulator učinaka P4, dok su PR-A i PR-C njegovi antagonisti (16).

Pri visokim koncentracijama P4 inhibira lučenje FSH i LH preko učinka na hipotalamus i hipofizu. Prisutnost P4 tijekom luteinske faze također dovodi do pada pulsatilnosti GnRH u hipotalamusu. Pri niskim koncentracijama P4 može stimulirati oslobađanje LH, i to samo nakon izlaganja estrogenima i P4. P4 također izaziva trošenje estrogenskih receptora, što je zapravo mehanizam zaštite protiv hiperplazije endometrija izazvane P4 (16).



Slika 4. Shematski prikaz $\Delta(\text{delta})5$ i $\Delta(\text{delta})4$ puta u nastanku spolnih hormona.

Ključni korak u tom procesu jest bočno cijepanje lanca kolesterola (P450scc). U folikularnoj fazi ciklusa pregnenolon se pretvara u androstendion kroz $\Delta(\text{delta})^5$ put preko 17-hidroksipregnenolona i DHEA-sa. S druge strane, žuto tijelo pretvara pregnenolon u P4 kroz $\Delta(\text{delta})^4$ put preko $3\beta(\text{beta})$ hidroksteroide dehidrogenaze (3β HSD) – s dopuštenjem autora (16)

Androgeni su glavni proizvod teka stanica. Androgeni su steroidi s 19 ugljikovih atoma i uključuju: androstendion, testosteron i dihidroepiandrosteron (DHEA). Glavni androgen koji izlučuju teka stanice jest androstendion. Većina testosterona nastaje perifernom pretvorbom androstendiona uz djelovanje 17β -hidroksteroide dehidrogenaze. Pod djelovanjem FSH, androstendion i testosteron dalje se aromatiziraju u granulosa stanicama i pretvaraju u estrogene (Slika 4.) (16).

Androgeni receptor postoji u 2 oblika: B obliku, koji je pune duljine, te A obliku, koji je kraći. Androgeni i progestini mogu unakrsno reagirati na njihov receptor, ali samo kada su prisutni u visokim koncentracijama (16).

U preovulacijskim folikulima, preferirani steroidni put za sintezu androgena i estrogena je $\Delta(\text{delta})^5$ put koji uključuje pretvorbu pregnenolona u 17-hidroksipregnenolon. U teka stanicama, 17-hidroksipregnenolon se pretvara u androgene. Zbog nemogućnosti teka stanica da metaboliziraju androgene, oni se transportiraju do granulosa stanica, gdje dolazi do njihove aromatizacije (Slika 4.) (16). S druge strane, preferirani put steroidogeneze u žutom tijelu jest $\Delta(\text{delta})^4$ put pri kojem dolazi do pretvorbe pregnenolona u P4. Jedan od ključnih koraka u steroidogenezi bočno je cijepanje lanca kolesterola u pregnenolon. Ovaj korak u jajniku je reguliran s LH. Stimulacija LH dovodi do povećanja proizvodnje cAMP-a (cikličkoga adenozin mono-fosfata) uz povećanu receptorsku mRNA za lipoproteine niskog stupnja gustoće (LDL) i posljedično do povećanog preuzimanja LDL-a. LDL je glavni oblik kolesterola koji se rabi za steroidogenezu. cAMP-aktivirani steroidogenički akutni regulatorni protein (StAR) povećava transport kolesterola kroz mitohondrijalnu membranu, gdje dolazi do bočnog cijepanja kolesterola. Od ove točke mogu se proizvoditi svi preostali hormoni jajnika (16).

1.3.3. FAZE MENSTRUACIJSKOGA CIKLUSA

Menstruacijski ciklus dijeli se u 3 faze:

- folikularnu (proliferativnu) fazu
- ovulaciju
- luteinsku (sekrecijsku) fazu

Prosječna duljina trajanja ciklusa je 28 dana, iako kod većine žena ciklus traje između 25 i 30 dana. Razlika u duljini trajanja ciklusa ovisi o varijabilnosti duljine folikularne faze, dok je duljina trajanja luteinske faze konstantna i traje 14 dana (16).

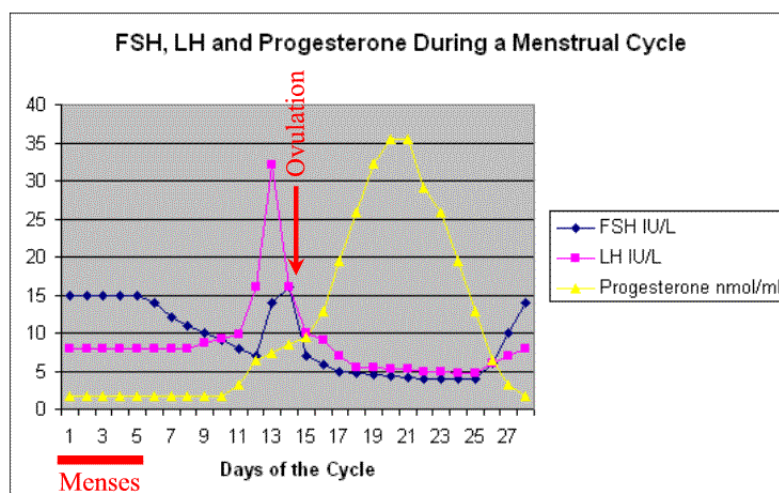
Folikularna faza ciklusa počinje početkom menstruacije i traje do ovulacije. Za vrijeme ove faze ciklusa dolazi do folikulogeneze (37). Već potkraj luteinske faze prethodnoga ciklusa propada žuto tijelo i znatno opada proizvodnja P4, E2 i inhibina A. Na taj način prekida se inhibicijsko djelovanje hormona žutoga tijela na gonadotropine preko negativne povratne sprege. Dva dana prije menstruacije počinje porast FSH, čime ujedno počinje i

odabir malih antralnih folikula za novi ciklus. Taj porast FSH traje sve do sredine folikularne faze. Kasnije nastupa porast LH, koji je slabije izražen uz pojačane oscilacije. Time LH pomaže u steroidogenezi i rastu folikula (38).

Porastom FSH i pojačanom pulsatilnošću LH odabire se za novu folikulogenezu 20 do 30 malih antralnih folikula koji su probuđeni iz latentne faze te počinje faza brzog eksponencijalnoga rasta folikula. Međutim, paralelno uz rast folikula, mnogobrojni folikuli svakodnevno propadaju i postaju atretični. U estrogenim mikrouvjetima folikul će rasti i dozrijevati, a u androgenima će se zaustaviti u rastu i završiti atrezijom (38).

Povišena razina FSH te umnoženi receptori za FSH povisuju aktivnost P450 aromataze koja iz androgena stvara sve više E2, te na taj način raste razina E2. Za povoljan odnos u proizvodnji androgeni/E2 važna je dozirana biosinteza androstendiona i testosterona u teka stanicama. Androgena je ovisna o enzimima (3β -HSD i P450 c17) koji stimuliraju LH. U početku folikularne faze aktivin koči stvaranje androgena, čime doprinosi estrogenizaciji folikula. Zahvaljujući tome, folikul raste idućih 5 dana, a zatim raste proizvodnja inhibina i folistatina u njegovim granulosa stanicama. Nakon 5. dana folikularne faze opada proizvodnja i aktivnost aktivina. Inhibin, folistatin i IGF-I (eng. *Insulin-like growth factor 1* - čimbenik rasta poput inzulina 1) parakrino potiču proizvodnju androgena. Kada su androgeni previsoki, inhibiraju aromatazu (38).

Prvih 7 dana folikularne faze odabire se 6 do 8 zdravih folikula koji proizvode sve veću količinu E2, aktivina i inhibina B. Do sredine folikularne faze oni dosegnu veličinu od 7 do 8 mm u promjeru. Sedmi dan folikularne faze je prijeloman (38). Iz bazena rastućih folikula odabire se dominantni folikul koji će u konačnici ovulirati. Rast folikula tijekom ove faze ciklusa ovisi o hormonima hipofize poput FSH. Nadalje, rast folikula dovodi do proizvodnje E2 od strane granulosa stanica. E2 je tijekom ove faze odgovoran za zadebljanje endometrija maternice (37).



Slika 5. Hormonske promjene tijekom menstruacijskoga ciklusa – s dopuštenjem autora
(40)

Ovulacija nastupa na vrhuncu rasta folikula kao odgovor na porast LH (37). Neposredno prije ovulacije folikul raste na više od 20 mm u promjeru (39). Zatim dolazi do oslobađanja LH iz prednjeg režnja hipofize mehanizmom pozitivne povratne sprege uslijed produljene izloženosti E2 (Slika 5.). Da bi došlo do ove pozitivne povratne sprege, vrijednosti E2 moraju biti više od 200 pg/mL tijekom 50 sati. Oko 12 sati nakon porasta LH, nastupa ovulacija. Da bi se oslobodila jajna stanica iz folikula, aktivira se nekoliko proteolitičkih enzima i prostaglandina, čime dolazi do razgradnje kolagena zida folikula. Kada se oslobodi jajna stanica, ona odlazi u jajovod, gdje čeka oplodnju (16).

Luteinska faza započinje nakon ovulacije. Tijekom ove faze ciklusa, preostale granuloza stanice, koje nisu oslobođene s jajnom stanicom za vrijeme ovulacije, uvećavaju se i stječu lutein. Ove granuloza stanice nazivaju se sada žutim tijelom i dominantno luče P4 (16). Pod utjecajem LH žuto tijelo proizvodi svakodnevno 150% više P4 (38). Najviše se P4 luči tjedan dana nakon ovulacije (slika 5.), a najviše u velikim luteinskim stanicama. One čine 20 do 30% svih stanica žutoga tijela. Žuto tijelo proizvodi i E2, koji je tek 30% niži od preovulacijske razine E2 (38). P4 je nužan za zadebljanje endometrija maternice i transformaciju endometrija iz proliferativne u sekrecijsku fazu u postupku pripreme za implantaciju zametka. Iz toga razloga će životni vijek žutoga tijela i, posljedično, lučenja P4,

ovisiti o kontinuiranoj potpori LH iz prednjeg režnja hipofize. Ako dođe do trudnoće, humani korionski gonadotropin (hCG) održavat će žuto tijelo, međutim, ako ne dođe do trudnoće, žuto tijelo pretvorit će se u ožiljkasto bijelo tijelo. Gubitak žutoga tijela i posljedični pad P4 dovodi do nestabilnosti i ljuštenja endometrija, što zapravo signalizira novi menstruacijski ciklus (16).

1.4. STIMULACIJSKI PROTOKOLI

Stimulacija jajnika integralni je dio postupaka izvantjelesne oplodnje. Usporedo s razvojem i napretkom laboratorijskih uvjeta i tehnika, razvoj protokola ovarijalne stimulacije zaslužan je za napredak IVF tehnologija. S obzirom na heterogenost pacijentica koje ulaze u postupak izvantjelesne oplodnje, zajedno s prisutnošću različitih lijekova koji se koriste pojedinačno ili u kombinacijama, nužno je odabrati adekvatan stimulacijski protokol.

Talijanski nacionalni IVF registar je 2010. godine registrirao 52 676 IVF postupaka. Od ukupnog broja postupaka, 9,9% (5215 postupaka) obustavljeno je prije aspiracije jajnih stanica od kojih 6,7% zbog lošeg odgovora jajnika na stimulaciju, 1,5% zbog rizika od razvoja sindroma hiperstimulacije jajnika (OHSS) a 1,77% zbog drugih uzroka. Drugim riječima, gotovo 5000 IVF postupaka prekine se svake godine zbog neadekvatnog odgovora jajnika na stimulaciju gonadotropinima. Kod pacijentica mlađih od 35 godina prekinuto je 8,1% IVF postupaka, a pretpostavlja se da je u ovoj populaciji pacijentica rizik od OHSS-a glavni uzrok prekida. Stopa obustave IVF postupaka viša je i kod žena starijih od 40 godina i kreće se od 11,5% u starosnoj skupini od 40. do 42. godine do 17,4% u starijih od 43 godine zbog lošega odgovora jajnika na stimulaciju (41).

Gotovo 40% parova odustane od izvantjelesne oplodnje nakon prvoga postupka. Neadekvatan odgovor jajnika na stimulaciju, koji pacijentice najčešće ne očekuju, dovodi do napuštanja IVF-a kao metode liječenja neplodnosti kod 10% parova (42).

Ključna odluka u stimulaciji jajnika jest izbor početne doze gonadotropina. Mnogobrojna istraživanja su se, u zadnjem desetljeću, bavila predviđanjem odgovora jajnika na stimulaciju (43, 44). Procjena pričuve jajnika nužna je prije početka stimulacije kao i

procjena odgovora jajnika na stimulaciju. Rezultati tih procjena diktiraju izbor početne doze gonadotropina kao i izbor protokola stimulacije (44).

U uporabi su danas različiti protokoli, ovisno o tome želi li se postići monofolikularni ili multifolikularni razvoj. Kod pacijentica s anovulatornim ciklusima cilj je tretmana postići razvitak najmanje jednoga folikula, dok je kod drugih uzroka neplodnosti cilj povećati broj folikula u postupcima koji se nazivaju **kontrolirana ovarijska hiperstimulacija (COH)** (45).

1.4.1. GONADOTROPINI

Uloga gonadotropina u stimulacijskim protokolima u postupcima izvantjelesne oplodnje poznata je odavno. Kod pacijentica koje ne reagiraju na standardne stimulacijske protokole, preporučuje se povećati dnevnu i ukupnu dozu gonadotropina (46). Prema većini autora, uobičajena doza za pacijentice sa slabim odgovorom na stimulaciju najmanje je 300 IJ/dan. Međutim, iako svi protokoli za pacijentice koje slabo reagiraju predviđaju visoke doze gonadotropina (obično 300-450 IJ/dan), više istraživanja nije dokazalo korist od ove metode (47). Dapače, Ben-Rafael i suradnici (48) dokazali su slabiju kvalitetu jajnih stanica pri uporabi visokih doza gonadotropina kod pacijentica s normalnim odgovorom na stimulaciju. S druge strane, Garcia-Velasco i suradnici (49) zaključili su da pacijentice sa slabim odgovorom na stimulaciju i normalnim bazalnim vrijednostima FSH mogu imati koristi od viših doza gonadotropina. Napokon, jedan pregledni rad u potrazi za dokazima o učinkovitosti povećane ukupne doze FSH >3000 IJ za pacijentice sa slabim odgovorom na stimulaciju, nije uspio dokazati korist od povećane doze hormona (50).

1.4.2. GnRH AGONISTI

Uporaba GnRH agonista (GnRH-a) u IVF protokolima pokazala se vrlo korisnom za stimulaciju jajnika. Metode MPO-a poboljšale su se tako da se smanjio broj obustavljanja postupaka te da se, gotovo u potpunosti, ukinuo spontani porast LH i reducirao neadekvatan razvitak folikula, čime su se poboljšale i stope kliničkih trudnoća (51). Strategije superovulacije koje kombiniraju uporabu GnRH-a i humanog menopauzalnog gonadotropina

(hMG) ili rekombinantnog FSH (rFSH) mogu se podijeliti u 3 kategorije: dugi, kratki i ultra-kratki protokoli. Dominacija dugih protokola vrlo je dobro poznata u IVF/ICSI ciklusima. Uspoređivane su pacijentice s visokim vrijednostima E2 15. dana stimulacije i pacijentice sa slabim odgovorom na stimulaciju te se pokazalo da je produljenje GnRH-a u prvoj skupini do uvođenja hMG u terapiju imalo povoljan učinak na razvitak zametka te stopu kliničkih trudnoća, dok se u drugoj skupini registrirao slab odgovor na GnRH-a. Upravo zato počeli su se istraživati alternativni načini uporabe GnRH-a kako bi se poboljšale stope trudnoća kod ovih pacijentica (47).

1.4.3. GnRH-a U LUTEINSKOJ FAZI

Ovaj protokol karakterizira se uporabom niskih doza GnRH-a (0,1–1 µg), koja započinje tijekom srednje luteinske faze ciklusa, a završava u vrijeme menstruacije ili neposredno nakon nje u kombinaciji s gonadotropinima. Reduciranjem učinka GnRH-a na njihove receptore na jajnicima smanjuje se supresija jajnika i povećava se njihov odgovor (52). Ovaj vid uporabe GnRH-a pokazao se učinkovitim kod pacijentica sa slabim odgovorom na stimulaciju gdje se, u velikim nerandomiziranim serijama, registrirala bolja stopa dobivenih jajnih stanica te stopa trudnoća. Međutim, drugi autori su pokazali vrlo malu ili nikakvu korist od ovoga vida stimulacije uz potrebu za visokim dozama GnRH-a (47).

Alternativni pristup, kako bi se smanjila doza GnRH-a tijekom luteinske faze, jest da se dopusti nishodna regulacija bez potpune inhibicije odgovora jajnika na egzogene gonadotropine, što se pokazalo učinkovitim za E2, gdje su zabilježene visoke vrijednosti E2, ali na stopu implantacije nije imao učinka. U jednom istraživanju GnRH-a uvedeni su tijekom srednje luteinske faze, a smanjili su se za pola kada je počela stimulacija gonadotropinima. Ukupna doza gonadotropina bila je niža, stimulacija je bila brža, dobiveni su zametci bolje kvalitete, a stopa obustavljanja bila je niska (47).

1.4.4. "STOP" GnRH-a PROTOKOL

"Stop" GnRH-a protokol podrazumijeva prekid uporabe GnRH-a kada se postigne supresija hipofize i početak stimulacije jajnika s hMG ili rFSH nakon toga (53). Pretpostavka

je, naime, da nastavak uporabe GnRH-a, čak i pri niskim dozama tijekom COH-a, može imati nepovoljan učinak kod pacijentica sa smanjenom rezervom jajnika. Jedan od mogućih problema ovoga protokola jest potencijal za povišenu incidenciju spontanoga porasta LH i prijevremene ovulacije. U istraživanjima u kojima je rabljen ovaj protokol pokazalo se da nije bilo razlike u stopama implantacije i kliničke trudnoće, iako je dobiven znatno veći broj jajnih stanica i znatno reducirana doza gonadotropina (54).

Manji broj istraživanja nije pokazao poboljšanje u stopi trudnoća ili stopi obustavljanja, dok je većina drugih prospektivnih istraživanja zabilježila veći broj dobivenih jajnih stanica, bolju stopu trudnoća te nižu stopu obustavljanja ciklusa (47).

1.4.5. UČINAK GnRH-a NA SINTEZU FSH I LH („FLARE UP“ PROTOKOL)

Kod „flare up“ protokola, uporaba GnRH-a započinje u folikularnoj fazi, a stimulacija gonadotropinima počinje nekoliko dana poslije. Koncepcija ovoga protokola temelji se na dodavanju agonističkoga učinka GnRH-a na aktivnost gonadotropina, čime se eliminira pretjerana supresija jajnika. Međutim, rezultati ovoga protokola u literaturi su u suprotnosti s jednom grupom autora koja je dokazala bolju stopu trudnoća, manju stopu spontanih pobačaja, nižu dozu gonadotropina te nižu stopu odustajanja, dok drugi nisu uspjeli dokazati superiornost ovog stimulacijskoga protokola u odnosu na protokole s luteinskim početkom administracije GnRH-a. Razlog za slabije rezultate druge skupine autora vjerojatno treba tražiti u znatnom porastu vrijednosti LH, P4 i testosterona u serumu tijekom rane folikularne faze koje ostaju visoke do administracije hCG-a. Na taj način dolazi do neadekvatne luteolize koja ima nepovoljan učinak na folikulogenezu i na jajne stanice, čime uzrokuje slabije rezultate ovoga protokola (47).

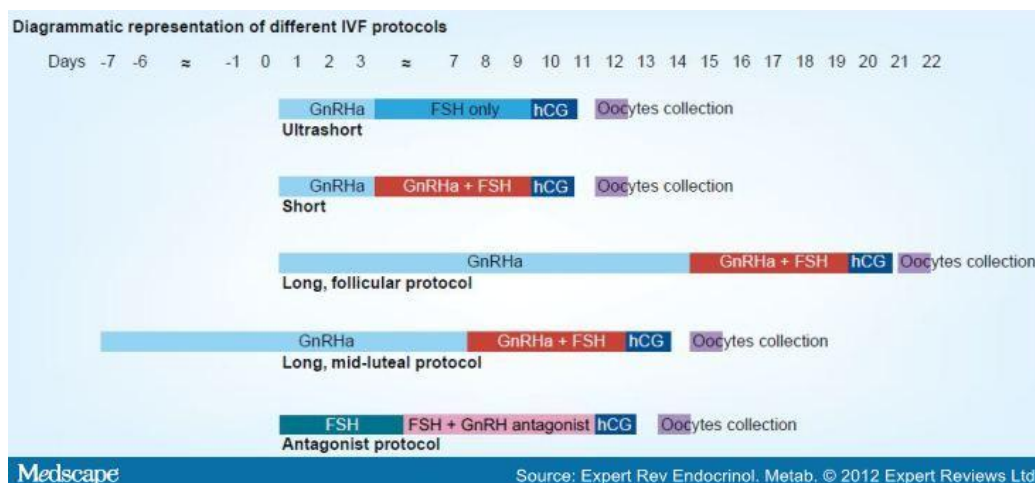
1.4.6. UČINAK GnRH-a NA SINTEZU FSH I LH S MALIM DOZAMA AGONISTA

Protokol s malim dozama GnRH-a alternativna je shema „flare up“ protokola u kojem je doza GnRH-a smanjena na vrijednosti od 25–50 µg u jednoj dozi, a kao predtretman koriste se oralni kontraceptivi (OK) ili P4. Dokazana je korist ovoga protokola s poboljšanjem u vrijednostima E2, broju folikula i zrelih jajnih stanica, stopi otkazivanja, stopi

implantacija i kliničkih trudnoća. Uporaba oralnih kontraceptiva ili progestina prije tretmana potencijalno bi mogla obustaviti funkciju perzistentnoga žutoga tijela iz prethodnoga ciklusa, što je i pokazano u istraživanjima koja su uključila pacijentice s normalnim odgovorom na stimulaciju kroz poboljšani odgovor jajnika na stimulaciju, eliminiranje prijevremenog porasta LH, smanjenu dozu uporabljenih gonadotropina i izostanak štetnoga učinka na stopu trudnoća. Nadalje, ako se progestin rabi 12-20 dana prije ushodnoga protokola kod žena sa slabim odgovorom na stimulaciju, registrirane su smanjene vrijednosti LH i P4 tijekom rane stimulacije gonadotropinima (47). S druge strane, Al-Mizyen i suradnici (55) nisu pokazali poboljšani ishod IVF-ET kod pacijentica sa slabim odgovorom jajnika na stimulaciju, a koje su rabile OK ili gestagene prije ushodnoga protokola stimulacije. Slične rezultate dobili su i drugi znanstvenici (46). Stoga su nužna daljnja istraživanja koja će pokazati potencijalnu korist uporabe OK prije započinjanja ushodnoga protokola s malim dozama GnRH-a (47).

1.4.7. KRATKI PROTOKOL

Rezultati stimulacije jajnika s kratkim protokolom i uporabom rFSH s ili bez LH u IVF/ICSI postupcima istraživani su kod pacijentica s višekratnim neuspjehom IVF-a i starosti 37 i više godina. Kod ove skupine pacijentica pokazalo se da su vrijednosti FSH > 9 mIU/mL povezane s slabim uspjehom IVF-a čak i uz uporabu hMG (56). Bolja kvaliteta i broj transferiranih zametaka zabilježena je u rFSH + hMG skupini, a ako se doda LH na početku stimulacije jajnika u težim slučajevima, bolja je mogućnost za trudnoću. Razlog za bolji rezultat vjerojatno je u boljem razvitku zametaka kada se LH uvede na početku stimulacije nego tijekom kasne folikularne faze (57). Napokon, istraživanje Weissmana i suradnika (58) pokazalo je da, pacijentice sa slabim odgovorom jajnika na stimulaciju, imaju bolje rezultate ako se rabi kratki u odnosu na dugi protokol.



Slika 6. Sheme različitih stimulacijskih protokola – s dopuštenjem autora (59)

1.4.8. PROTOKOL S GnRH ANTAGONISTIMA (GnRH-ant)

Uporaba GnRH-ant sprječava prijevremeni porast LH, omogućava maksimalnu mobilizaciju jajnih stanica minimizirajući supresorni učinak GnRH-a na receptore jajnika i eliminirajući supresiju jajnika na razini mobilizacije folikula. Nekoliko sati nakon njihove primjene nastupa tranzitorna supresija gonadotropina, za razliku od GnRH-a, gdje slijedi stimulacija („flare-up“) gonadotropina. Prijevremena luteinizacija također je smanjena u protokolu s GnRH-ant, a ovaj protokol ima više različitih koristi za pacijentice, uključujući kraću stimulaciju, manje doze gonadotropina i manji rizik za formiranje cista. Jedini nedostatak ovoga protokola jesu nešto niže razine E2 u serumu s posljedičnom nižom stopom implantacije i kliničke stope trudnoća (47).

Neki autori ne slažu se sa stavom da pacijentice sa slabim odgovorom na stimulaciju treba stimulirati visokim dozama gonadotropina u GnRH-ant protokolima. U tom smislu trebalo bi razmotriti manje agresivne i skupe stimulacije. Uporaba CC-a (klomifen-citrata) u kombinaciji s malim dozama gonadotropina i GnRH-ant predstavlja alternativu, smanjujući potrebu za visokim dozama gonadotropina s istim ishodom. Kratki protokoli s GnRH-ant i malim dozama gonadotropina trebali bi biti standard za stimulaciju pacijentica s velikim

brojem antralnih folikula i visokim AMH, odnosno populacijom u kojoj se očekuje pretjerani odgovor na stimulaciju (41).

Istraživanja su pokazala da uporaba GnRH-ant snižava rizik od OHSS-a, kao i obustavljanje postupaka zbog rizika od OHSS-a (60). U ovome protokolu početna regrutacija folikula vrši se pod kontrolom endogenih gonadotropina u luteinskoj fazi ciklusa koji prethodi stimulaciji jajnika. Samim tim manji je broj rastućih folikula u usporedbi s dugim GnRH-a protokolom. Stimulacija traje kraće, a najvažnije je to što primjena GnRH-ant omogućuje da se skok LH izazove s jednim bolusom GnRH-a, čime se dodatno snižava rizik od OHSS-a (61).

1.5. POVIŠEN PREOVULACIJSKI PROGESTERON I UTJECAJ NA ISHOD TRUDNOĆE NAKON POSTUPKA IZVANTJELESNE OPLODNJE

U menstruacijskom ciklusu funkcionalna luteoliza karakterizirana je gubitkom sposobnosti žutog tijela i stvaranja P4 i normalno vrijednosti P4 dosežu svoju najnižu točku (<1,5 nmol/L) tijekom rane folikularne faze (62). Dokazano je da je glavni sekretorni izvor P4 u ranoj folikularnoj fazi nadbubrežna žlijezda, dok jajnici predstavljaju glavni izvor cirkulirajućeg P4 u kasnoj folikularnoj fazi (63). Kliničko značenje povišenih vrijednosti P4 u ranoj folikularnoj fazi menstruacijskog ciklusa 4. i 5. dana ciklusa smatra se rezultatom neadekvatne luteolize. Kako je prisutan u 11,3% infertilnih pacijentica, sugerirano je da može negativno utjecati na fekdaciju (64). Unatoč tomu, dostupna je ograničena količina informacija o prevalenciji povišenih vrijednosti P4 u ranoj folikularnoj fazi tijekom indukcije ovulacije i njegovu utjecaju na ishod IVF-a. Koristeći se kratkim protokolom s GnRH-a i visoke doze FSH-a kod pacijentica sa slabim odgovorom na indukciju, 85% ciklusa izloženo je porastu P4 (>3,18 nmol/L) između 2. i 6. dana ciklusa (65). U kasnijem istraživanju, u kojem je korišten kratki protokol s GnRH-a, 32% pacijentica imalo je povišene bazalne vrijednosti P4 (>3,18 nmol/L) 4. dana stimulacije (66). U ciklusima s GnRH-a kod kojih se koristio dugi protokol, pokazalo se da su mjerljive vrijednosti P4 (>0,9858 nmol/L) povezane s višom stopom odustajanja i nižom stopom fertilizacije kod povišenih vrijednosti P4 (0,954- <3,18 nmol/L) 5. dana stimulacije (67). Kod pacijentica koje su tretirane GnRH-antom i rFSH u IVF postupku, u 4,9% ciklusa bile su prisutne povišene vrijednosti P4 2. dana ciklusa

i zaključeno je da je prisutnost povišenih vrijednosti P4 povezana sa smanjenom mogućnošću trudnoće (68).

Porast je preovulacijskog P4 pri indukciji ovulacije, prije uvođenja analoga GnRH, često bio prisutan u kasnoj folikularnoj fazi kod davanja hCG-a u žena u IVF postupku. To se događa kao posljedica nekontroliranog porasta LH, uslijed čega se naziva i „prematurna luteinizacija“. Uvođenjem i primjenom GnRH analoga pri indukciji ovulacije gonadotropinima kod postupka izvantjelesne oplodnje, smatralo se da će analozi onemogućiti porast prijevremenog LH i preovulacijskog P4 na dan primjene injekcije hCG (69). Ipak, unatoč tomu što se GnRH analozima pri indukciji ovulacije onemogućava preuranjeni porast LH, i dalje se javlja umjereni porast P4 u 12,4 do 52,3% slučajeva. Smatra se da je preovulacijski porast P4 u ciklusima s GnRH analozima posljedica indukcije ovulacije *per se* te da je srazmjern primijenjenoj dozi FSH, koncentraciji E2, broju folikula i aspiriranih jajnih stanica. Primjena relativno visokih doza FSH neophodna je za postizanje multifolikularnoga rasta i pokazalo se da bi na prijevremeni porast preovulacijskoga P4 mogle utjecati veće doze FSH. Naime, FSH stimulira ekspresiju 3β HSD i biosintezu P4, kao i ekspresiju drugih steroidogeničkih enzima, koji su neophodni za sintezu estrogena. Na taj način povećana je pretvorba pregnenolona u P4, a samim time i vrijednost preovulacijskoga P4 (70). Uloga preovulacijskog P4 u pogledu utjecaja na ishod IVF-a još nije posve razjašnjena i u posljednje vrijeme predmet je mnogobrojnih istraživanja i rasprava (70, 71). Usto nesuglasnosti pridonosi neujednačena diskriminacijska granica između normalnih i povišenih vrijednosti P4 koja se kreće u širokom rasponu između 2,5–7 nmol/L, premda se najčešće koristi vrijednost od 4,77 nmol/L (72, 73). Jedna skupina istraživača smatra da povišena koncentracija preovulacijskog P4 (>1,5 ng/ mL vs. 4,77 nmol/L) dovodi do ubrzane sekrecijske transformacije endometrija, slabije receptivnosti i skraćivanja vremena za implantaciju, što se nepovoljno odražava na ishod IVF trudnoće - nižom stopom zanošenja i kliničkom stopom trudnoća (74-76). Naprotiv, drugi istraživači nisu utvrdili nepovoljan utjecaj povišenih koncentracija preovulacijskog P4 (3 do 7 nmol/L) na ishod trudnoće nakon IVF postupka u odnosu na bolesnice s normalnim razinama P4 (77, 78). Neki autori ističu osobe koje dobro reagiraju na indukciju ovulacije (*high responder*, E2>3000 pg/mL, broj dobivenih jajnih stanica >20), kod kojih povišena koncentracija preovulacijskog P4 (>5,724 nmol/L) nema znatnije važnosti za ishod trudnoće nakon IVF postupka (79, 80).

1.6. STRATEGIJE ZA PREVENCIJU NEPOVOLJNOG DJELOVANJA PREOVULACIJSKOGA PROGESTERONA

S obzirom na dokazani negativni učinak povišenog preovulacijskoga P4 na ishod IVF postupaka, nužno je naći načine minimiziranja njegova utjecaja. Različita istraživanja bavila su se upravo ovim problemom (81, 82) te predložila nekoliko strategija za prevladavanje ovoga problema.

1.6.1. BLAGI STIMULACIJSKI PROTOKOLI

Pri blagim stimulacijskim protokolima registrirane su niže razine E2 te bi zbog toga oni mogli biti korisni u prevenciji prijevremenoga porasta P4. Niže razine E2 mogu se postići ograničenom uporabom gonadotropina ili uporabom antiestrogena ili inhibitora aromataze s obzirom na to kako je poznato da oni smanjuju potrebnu dozu gonadotropina i E2 (81). Svega 3 randomizirana kontrolirana istraživanja, koja su uključila 80 žena, istraživala su uporabu inhibitora aromataze u IVF postupcima, iako su nova istraživanja iz ove oblasti obećavajuća (81). Međutim, unatoč činjenici da blagi stimulacijski protokoli uspješno umanjuju rizik od prijevremenoga porasta P4, zabilježene su i niže stope trudnoća po ciklusu i manje zametaka za krioprezervaciju, a još nisu dostupni individualizirani algoritmi za doziranje FSH (84). Važno je uzeti u obzir starost pacijentice, ovarijalnu rezervu, stupanj razvitka zametka i kapacitet krioprezerviranih zametaka kada se rabe blagi stimulacijski protokoli u IVF postupcima (82).

1.6.2. RANIJA PRIMJENA PREOVULACIJSKOGA hCG-a

Pravo vrijeme uporabe hCG-a za finalnu maturaciju jajnih stanica u različitim stimulacijskim protokolima ovisi o broju i veličini folikula (70). Kao druga strategija za prevladavanje preranoga porasta P4, predložena je ranija uporaba hCG-a, i to kada folikuli dosegnu veličinu od 15-16 mm u promjeru. Kada 3 i više folikula dosegnu veličinu od 16 mm i više u promjeru na ultrazvučnome pregledu, hCG bi se trebao ordinirati (85). Kako bi se izbjegao porast preovulacijskoga P4 i time njegov štetni učinak na ishod izvantjelesne oplodnje, predložena je ranija uporaba hCG-a kod *high respondera* u odnosu na *normal* i *poor respondere*. Ranija uporaba hCG-a kod bolesnica stimuliranih rFSH/GnRH

antagonistima rezultirala je znatnim razlikama među skupinama s ranijom i kasnijom uporabom hCG-a glede razine E2 (1388 prema 2040 pg/mL) i P4 (2,5 prema 3,5 nmol/L) na dan hCG-a (70). Međutim, ranija uporaba hCG-a pokazala se uspješnom samo kada je riječ o sprječavanju prijevremenoga porasta P4, dok nije imala utjecaja na poboljšanje stopa trudnoća. Upravo zato bi ova strategija mogla biti uspješnija kod pacijentica s jakim odgovorom na stimulaciju u odnosu na pacijentice s normalnim i slabim odgovorom. Istraživanja koja su analizirala povezanost veličine folikula i morfologije jajnih stanica kod bolesnica stimuliranih s hMG, zaključila su da se jajne stanice mogu dobiti čak i iz malih folikula, promjera 11 mm. Time je pokazano da ranija uporaba hCG-a za finalnu maturaciju jajnih stanica neće kompromitirati sveobuhvatnu kvalitetu kohorte jajnih stanica kada je većina folikula još mala (70).

Kada se u obzir uzmu potencijalne prediktivne vrijedosti E2 za porast P4, finalna maturacija jajnih stanica trebala bi se dogoditi kada vrijednosti E2 budu takve da prijete opasnost od porasta preovulacijskoga P4 (82).

1.6.3. TRANSFER ZAMETAKA 5. DANA

Oporavak endometrija prije transfera također je potencijalna strategija kako bi se onemogućio štetan utjecaj napredne endometrijalne maturacije. U tom smislu više je istraživanja uspoređivalo transfer zametaka 3. i 5. dana, gdje je zabilježena viša stopa trudnoća kod transfera 5. dana u odnosu na transfer 3. dana (86, 87), odnosno, veća stopa ranih pobačaja kod transfera 3. dana u odnosu na transfer 5. dana u GnRH antagonističkim stimuliranim ciklusima (82). Ako se analizira razvojni stupanj i stopa fragmentacije zametaka, na implantacijski potencijal blastociste utječu razvojni stupanj 5. dana te stopa fragmentacije 3. dana transfera zametaka (82). Vjerojatni razlog za nižu stopu implantacije zametka 3. dana kod povišenih vrijednosti preovulacijskoga P4 poremećeni je odnos između zametka i endometrija, dok se kod transfera zametka 5. dana očekuje bolja stopa implantacije jer se pretpostavlja da dolazi do oporavka endometrija od suprafizioloških vrijednosti P4 (82).

S druge strane, istraživanja kod kojih su u stimulaciji rabljeni GnRH-a i kod kojih su serumske vrijednosti $P4 \geq 2,0$ ng/mL na dan hCG-a, nisu potvrdila bolju stopu implantacije i živorođene djece (88), a slično je i s istraživanjem iz 2013. godine (89). Međutim, s obzirom na to da je većina istraživanja dokazala bolju stopu implantacije kod transfera zametka 5. dana u odnosu na transfer 3. dana, odabir transfera u stadiju blastociste kao strategije za rješavanje problema povišenog preovulacijskoga P4 čini se opravdanim (82).

1.6.4. ELEKCIJSKA KRIOPREZERVACIJA ZAMETAKA I ODLOŽENI TRANSFER U PRIRODNOME CIKLUSU

Elekcijska krioprezervacija zametaka i odloženi transfer u prirodnome ciklusu predložena je kao način prevladavanja negativnoga učinka povišenog preovulacijskog P4 na ishod IVF-a, ali i u prevenciji nastanka OHSS-a (88, 90). Zabilježena je znatno bolja stopa zanošenja i kliničkih trudnoća kod transfera krioprezerviranih zametaka u odnosu na svježi transfer zametaka (80, 82). Smatra se da negativan učinak povišenog P4 izostaje kod krioprezervacije zametaka i naknadnog transfera krioprezerviranih zametaka (FET) u nestimuliranome ciklusu, s obzirom da dolazi do oporavka odnosa između zametka i endometrija, iako se slaba kvaliteta zametaka ne može eliminirati putem krioprezervacije. Tijekom zadnjeg desetljeća broj transfera krioprezerviranih zametaka po ciklusu se povećavao, a poboljšala se i stopa živorođene djece iz ovih ciklusa. Stoga je i krioprezervacija zametaka važnija danas nego ikada za kumulativnu stopu trudnoća. Strategija krioprezervacije svih zametaka u kojoj se svi zametci kriopohrane i transferiraju u kasnijem prirodnom ciklusu, pokazala se uspješnom u povećanju stope uspješnosti IVF ciklusa (82).

1.7. POSTOVULACIJSKI PROGESTERON I LUTEALNA POTPORA U POSTUPKU IZVANTJELESNE OPLODNJE

Istraživanja o utjecaju postovulacijskoga P4 na ishod IVF postupka bila su dosad oskudna. Jedna grupa autora smatra da je bolji ishod trudnoća u IVF postupku ako je E2 relativno povišen, a vrijednosti P4 visoke (91), dok druga grupa autora smatra da se intenzivno periovulacijsko sazrijevanje endometrija nepovoljno odražava na ishod IVF

postupka (92). U literaturi postoje i mnogobrojne nesuglasice glede vrijednosti postovulacijskog P4. Srednja vrijednost P4 određena nakon ovulacije 5. dana iznosi, ovisno o istraživanju, od 150 nmol/L do čak 315 nmol/L uz potporu žutog tijela s mikroniziranim P4 (93, 94). Ako se P4 određivao 3. dan (dan transfera zametka), njegova je srednja vrijednost iznosila 85 nmol/L, također uz progesteronsku potporu žutog tijela (95).

Problem postovulacijskoga P4 aktualizirao se tijekom zadnjih nekoliko godina. Različitim istraživanjima pokušalo se pokazati mogu li vrijednosti P4 u serumu tijekom srednje luteinske faze poslužiti kao prediktivni čimbenik za ishod IVF postupka te može li povećanje doze egzogenog P4 kod pacijentica s niskim vrijednostima tijekom srednje luteinske faze poboljšati stopu trudnoća (96). Stupanj luteolize izražen kroz vrijednosti P4 48 sati nakon aspiracije jajnih stanica bio je predmet nedavnog istraživanja u kojem se koristio GnRH-ant protokol, a završno sazrijevanje jajnih stanica postizalo se uporabom GnRH-a. Pokazalo se da je stupanj luteolize jako varirao među pacijenticama s vrijednostima P4 od 13,0 ng/mL (41,3 nmol/L) do $\geq 60,0$ ng/mL (190,8 nmol/L) mjerenim 48 sati nakon aspiracije jajnih stanica (97). Drugo istraživanje pokazalo je da završno sazrijevanje jajnih stanica uz uporabu GnRH-a izaziva izrazitu luteolizu koja ne može biti kompenzirana standardnom lutealnom potporom progesteronom te su, stoga, potrebne ili visoke doze P4 ili hCG za prevenciju luteolize. Međutim, pokazalo se, također, da luteoliza nije uvijek potpuna nakon uporabe GnRH-a za završno sazrijevanje. Kod *high responder* bolesnica procjena E2 i P4 vrijednosti u serumu 48 sati nakon aspiracije jajnih stanica pokazala je da je luteoliza uz GnRH-a *trigger* individualno specifična, čak i kod *high respondera* s jednakim brojem jajnih stanica (98).

Drugo istraživanje pokušalo je naći povezanost između vrijednosti postovulacijskoga P4 i uspješnog IVF ciklusa. Pokazalo se da je vrijednost P4 od 17 ng/mL (54 nmol/L) mjerena 7. dana nakon transfera zametka bolji prediktor uspješnog IVF postupka, ali da povećanje doze progesterona na 300mg dnevno kao luteinske potpore nije imalo utjecaja na uspješan ishod (96).

2. HIPOTEZA

Nepovoljan utjecaj povišenoga preovulacijskog P4 na ishod trudnoće pri stimulaciji ovulacije kod ispitanica ispitivane skupine u IVF postupku izostaje nakon normalizacije postovulacijskog P4 5. dana kod *normal respondera* i unatoč povišenom P4 5. dana kod *high respondera*.

3. CILJEVI RADA

3.1. OPĆI CILJ

Utvrđiti utjecaj preovulacijskog i postovulacijskog P4 nakon stimulacije ovulacije kod ispitanica ispitivane skupine u IVF postupku na ishod trudnoće kroz stopu zanošenja i kliničku stopu trudnoća kod *normal respondera* i *high respondera* transferom svježih i krioprezerviranih/odmrznutih blastocista

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI

- Analizirati ishod IVF postupka kod ispitivane skupine ispitanica s povišenom koncentracijom preovulacijskog P4 ($>4,77$ nmol/L) u odnosu na ispitanice kontrolne skupine bez povišenog preovulacijskog P4;
- Usporediti ishod IVF postupka u ispitivanoj skupini kod *normal respondera* s povišenim preovulacijskim P4 ($>4,77$ nmol/L) i sniženim postovulacijskim P4 (<315 nmol/L) uz transfer svježih blastocista, u odnosu na *normal respondere* s višim vrijednostima postovulacijskog P4 (>315 nmol/L) uz transfer krioprezerviranih/odmrznutih blastocista u prirodnom ciklusu;
- Usporediti ishod IVF postupka u ispitivanoj skupini kod *high respondera* s povišenim preovulacijskim i postovulacijskim P4 ($>4,77$ nmol/L vs. >315 nmol/L) uz randomizirani transfer svježih blastocista, u odnosu na transfer krioprezerviranih/odmrznutih blastocista u prirodnom ciklusu;

- Analizirati utjecaj postovulacijskoga P4 na ishod IVF postupka kod ispitanica kontrolne skupine u odnosu na ispitanice ispitivane skupine.

4. ISPITANICE I METODE

4.1. OPIS ISTRAŽIVANJA

Istraživanje predstavlja prospektivnu kohortnu studiju. Iz istraživanja su isključene one bolesnice kod kojih je P4 povišen 2., 3. i 4. dana ciklusa, žene starije od 37 godina, te *poor responder* bolesnice (broj folikula <4 na dan hCG, E2<500 pg/mL) jer se svaki od navedenih parametara nepovoljno odražava na ishod IVF postupka. Nadalje, bolesnice kod kojih je učinjen postupak intrauterine inseminacije (IUI) ili koje su u postupku MPO koristile antiestrogene (CC i Letrozol), kao i bolesnice koje su u istom postupku radi očuvanja fertilitnosti zbog maligne bolesti, također su isključene iz istraživanja. Sve druge bolesnice koje se podvrgavaju IVF postupku bile su uključene u istraživanje.

Prospektivno je analizirano 400 stimuliranih bolesnica u IVF postupku određivanjem P4 i E2 na dan davanja hCG. Bolesnice s normalnim vrijednostima preovulacijskog P4 (<4,77 nmol/L) predstavljale su kontrolnu skupinu (300 žena), dok su bolesnice s povišenim vrijednostima P4 (>4,77 nmol/L) predstavljale ispitivanu skupinu (100 žena). Ispitivana skupina dodatno je podijeljena na 2 podskupine; prvu skupinu (85 žena) predstavljale su *normal responder* bolesnice, dok su drugu skupinu (15 žena) predstavljale *high responder* bolesnice. Sve ispitanice bile su usklađene prema dobi, indeksu tjelesne mase (ITM), stimulacijskom protokolu i dozama gonadotropina te broju aspiriranih jajnih stanica i transferiranih zametaka. Sve bolesnice koje su, nakon objašnjenja o potencijalno nepovoljnom utjecaju povišenih vrijednosti P4 na ishod IVF-a, pristale na istraživanje, uvrštene su uz pismenu suglasnost.

Stimulacija ovulacije kod bolesnica provedena je analogima GnRH u kombinaciji s gonadotropinima, a njihova doza i odabir prilagođena je prema:

- dobi bolesnica
- vrijednosti FSH
- AFC (broj antralnih folikula)
- AMH
- ITM
- ranijem IVF postupku

Zbog veće ovarijske rezerve kod mladih bolesnica bile su potrebne niže doze lijekova za poticanje ovulacije u odnosu na starije. Kod bolesnica s policističnim jajnicima primijenjeni su preparati koji sadržavaju dominantno FSH i minimalnu koncentraciju LH. U slučajevima gdje postoji rizičnost sindroma hiperstimulacije jajnika primijenjeni su blaži stimulacijski protokoli s gonadotropinima u kombinaciji s GnRH antagonistima i GnRH agonisti za indukciju ovulacije. Lijekovi koji su se koristili za stimulaciju i indukciju ovulacije:

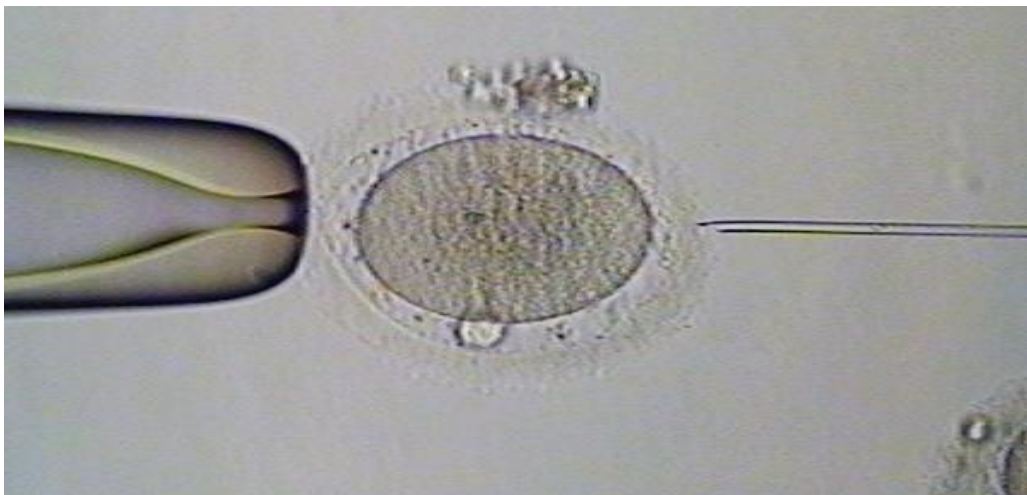
- Follitropin Alfa (Gonal F, MerckSerono, Njemačka)
- Follitropin Beta (Puregon, Organon, Nizozemska)
- Triptorelin (Decapeptyl SR, Ferring Pharmaceuticals, Švicarska)
- Cetorelix acetat (Cetrotide, MerckSerono, Njemačka)
- Korigonadotropin (Ovitrelle, MerckSerono, Njemačka)
- Menotropin (Menopur, Ferring Pharmaceuticals, Švicarska)

Folikulogeneza je praćena ultrazvučno i određivanjem E2. Ultrazvučni aparat na kojem su izvršeni pregledi jest Voluson S8, General Electric. Pri ultrazvučnim pregledima korištena je vaginalna sonda GE RIC5-9W-RS 3D/4D (4-9 MHz, 192 elementa, 11,6 mm, maksimalna dubina skeniranja 16cm). Kada se ultrazvučno utvrdilo na jajnicima više od 3 folikula u promjeru 17 mm i više, primjenjivan je hCG, a 36 sati kasnije izvršena je transvaginalna aspiracija jajnih stanica. Na dan aspiracije jajnih stanica pacijentice su bile na-tašte. Obavljen je pregled UZV-om radi plana aspiracije i identifikacije krvnih žila na mogućem putu punkcije. Uz prazan mjehur, u dorzalnom položaju i analgosedaciju (petantin i apaurin) ili lokalnu anesteziju, te uz pomoć vaginalnog UZV-a obavljena je punkcija svakog folikula promjera većeg od 17 mm. Prilikom transvaginalne punkcije folikula korištena je igla od 16 G promjera 1,1 mm. Aspirirana folikulinska tekućina je zatim predana u embriološki laboratorij i čekao bi se primarni izvještaj biologa o broju, zrelosti i kvaliteti dobivenih jajnih stanica. Atrofične i degenerirane jajne stanice isključivale su se iz daljnjeg postupka.

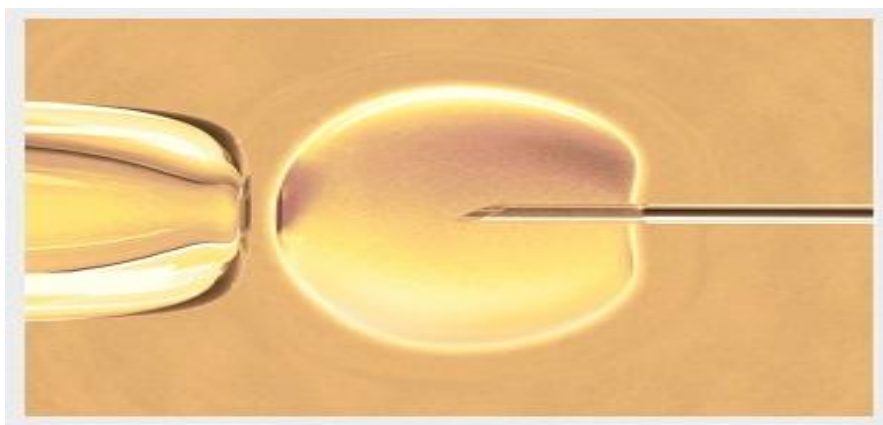
Razina P4 te omjer P4/E2 na dan hCG određivana je iz krvi automatiziranom imunokemiluminescencijskom metodom proizvođača Ortho Diagnostics, Johnson&Johnson. Pretrage koje su izvršene kod svih pacijentica rutinske su u obradi steriliteta. Sperma

muškaraca je analizirana i pripremljena u laboratoriju, nakon čega je izvršena oplodnja postupkom intracitoplazmatske injekcije spermija (ICSI).

Metoda ICSI jedna je od tehnologija izvantjelesne oplodnje. Nakon nužnog inkubiranja jajne stanice i spermija, gamete se pripreme za ICSI. Uz pomoć mikromanipulatora, pod mikroskopom se oocita učvrsti na mjestu blizu polarnog tjelešca. Imobilizirani spermij se usiše u mikropipetu, kojom prodre kroz zonu pelucidu i oolemu (na položaju 3 sata) i ostavi se u citoplazmu. Takva oocita ostavlja se u inkubatoru (CO_2 5-6%, 37°C) u hranidbenom mediju za zametke. Za odabir gameta koriste se danas i napredne metode – polarizoidni mikroskop, PISCI, IMSI, ali i one se temelje na morfološkim osobinama oocite, odnosno spermija (Slike 7 i 8).



Slika 7. Intracitoplazmatska injekcija spermija. Mikromanipulator učvršćuje jajnu stanicu (lijevo), a kontralateralno je mikropipeta s vidljivom glavom spermija, krajnje desno – s dopuštenjem autora (99)



Slika 8. Intracitoplazmatska injekcija spermija. Mikropipeta penetrira u jajnu stanicu, uvija se oolema, tik prije prsnuća. Glava spermija vidljiva na vrhu mikropipete – s dopuštanjem autora (100)

Embriolog je analizirao kvalitetu zametaka utvrđivanjem broja stanica, simetričnosti, granulacije, fragmentacije, kompakcije i multinuklearnih blastomera. Razvojni stupanj zametka, koji se definira kao broj blastomera prvog, drugog i trećeg dana nakon oplodnje, esencijalni je predikcijski čimbenik za implantaciju i stopu trudnoća (1 do >10 stanica). Za procjenu diobe zametka (broja blastomera) koristio se konsenzus Istanbulske radionice prema kojemu su optimalne stope diobe zametka sljedeće:

- Dan 1 (26 ± 1 h nakon ICSI postupka, 28 ± 1 h nakon IVF postupka) – 2 stanice
- Dan 2 (44 ± 1 h) – 4 stanice
- Dan 3 (68 ± 1 h) – 8 stanica

Rana dioba zametka, odnosno, prve mitoze koje se zbivaju prije 26 ± 1 h nakon ICSI postupka, 28 ± 1 h nakon IVF postupka, kao i nizak stupanj fragmentacije, korelirale su s brojem zametaka dobre kvalitete, razvojem blastocista te stopama trudnoće.



Slika 9. Dvo-stanični zametak s blastomerama jednake veličine gdje svaka blastomera sadržava po jednu jezgru – s dopuštanjem autora (101)



Slika 10. Osmostanični zametak s blastomerama jednake veličine i bez vidljivih jezgara – s dopuštanjem autora (101)

Na temelju vrijednosti E2 i broja dobivenih jajnih stanica odvojeno je promatrana skupina *normal responder* ispitanica ($E2 < 3000$ pg/mL, broj jajnih stanica < 20) u odnosu na *high responder* ispitanice ($E2 > 3000$ pg/mL, broj jajnih stanica > 20).

Kod svih bolesnica provedena je potpora žutoga tijela davanjem tableta mikroniziranog P4 vaginalno (Utrogestan, Laboratories Besins International, Francuska), koje su ispitanice koristile 12 dana u dnevnoj dozi od 600 mg (3 doze po 200 mg). Budući da

su sve ispitanice primale Utrogestan nakon aspiracije, mikronizirani P4 nije utjecao na rezultate istraživanja preovulacijskog P4. S obzirom na to da različite populacije imaju različitu razinu P4 nakon ovulacije 5. dana, u kontrolnoj skupini određena je srednja vrijednost P4 5. dana, koja je predstavljala diskriminacijsku granicu na temelju koje su bolesnice ispitivane skupine svrstavane za FET ili BET. U ispitivanoj skupini kod *normal respondera* s višim vrijednostima P4 5. dana od diskriminacijske granice načinjen je FET, a kod nižih vrijednosti korišten je BET. Kod *high respondera* s povišenim vrijednostima preovulacijskog i postovulacijskog P4 načinjen je randomizirano svježi ili odgođeni transfer blastocista.

Primarni ciljevi istraživanja uključivali su hormonski utvrđenu stopu trudnoća ili zanošenja i kliničku stopu trudnoća. Hormonski potvrđena trudnoća definirala se kao pozitivna vrijednost beta-hCG-a 14 dana nakon transfera zametaka, dok se klinička stopa trudnoća definirala kao pozitivna ultrazvučna vizualizacija gestacijske vrećice s 6 tjedana trudnoće uz prisutnu srčanu akciju zametka nakon transfera zametaka.

4.2. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Podatci su analizirani statističkim postupcima ispitivanja razlika i povezanosti programima SPSS 21 (IBM Corp. Released 2012 IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) i MedCalc Statistical Software version 13.1.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija; <http://www.medcalc.org>; 2014). Normalnom raspodjelom kontinuirane varijable smatrana je svedenost i zaobljenost raspodjela manja od 1. Pravilnost raspodjele provjerena je Smirnov-Kolmogorovljevim testom. Mjere centralne tendencije i raspršenja kontinuiranih varijabli opisno su izražene medijanom i rasponom za dob, odnosno medijanom i 25. te 75. percentilom za varijable koje imaju raspodjelu različitu od normalne. Mjere centralne tendencije i raspršenja kontinuiranih varijabli koje nemaju raspodjelu drukčiju od normalne opisno su izražene aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Nominalni pokazatelji prikazani su raspodjelom učestalosti po skupinama i udjelom. Za utvrđivanje razlika između više od 2 neovisna uzorka s normalnom raspodjelom korištena je ANOVA, zatim *post hoc* analiza (najčešće Tukey). Za utvrđivanje razlika između više od 2 neovisna uzorka nepravilne raspodjele upotrijebljena je Kruskal-Wallisova analiza varijance i

Mann-Whitney U-test za *post hoc* neparametrijsku analizu. Za utvrđivanje razlika među proporcijama između više od 2 neovisna uzorka upotrijebljen je Pearsonov χ^2 , pa χ^2 za *post hoc* analizu. Za utvrđivanje povezanosti uzorka korišten je Kendallov tau i Spearmanov rho test za neparametrijsku analizu, Pearsonov koeficijent povezanosti za pravilno raspodijeljene kontinuirane varijable, te metoda parcijalne korelacije za analizu utjecaja pojedine varijable na povezanost drugih, uz kontrolu. Prediktivne vrijednosti kontinuiranih varijabli, osjetljivost i specifičnost testa kao i pozitivni i negativni omjeri vjerojatnosti i prediktivne vrijednosti dobiveni su ROC analizom. Vjerojatnost pod pretpostavkom nul-hipoteze za dobivanje rezultata jednakog ili različitog od primijećenog postavljena je na granicu od 0,05.

Cijelo istraživanje provedeno je u Klinici za ženske bolesti i porode Petrova, Zagreb.

5. REZULTATI

U Klinici za ženske bolesti i porode Petrova, u razdoblju 2015.-2017. godine, provedeno je istraživanje na 400 ispitanica. Ispitanice su bile podijeljene u 2 skupine: kontrolnu i ispitivanu. Kontrolnu je skupinu činilo 300 ispitanica, a ispitivanu skupinu 100 ispitanica. Ispitivana skupina je, nadalje, podijeljena na 2 podskupine: podskupinu *normal respondera*, koja je uključivala 85 ispitanica i podskupinu *high respondera*, koja je uključivala 15 ispitanica.

S obzirom na životnu dob, nije bilo statistički značajne razlike između opisanih dvaju skupina ispitanica ($P=0,096$). U Tablici 1 prikazani su podatci za dob ispitanica.

Tablica 1. Životna dob ispitanica kontrolne i ispitivane skupine

Varijabla	Skupina ispitanica		Statistička značajnost	
	Kontrolna C (min.-maks.)	Ispitivana C (min.-maks.)	Z	P
Dob ispitanica (god.)	34 (20-37)	34 (20-37)	1,666	0,096

C – medijan; min. – najmanja vrijednost; maks. – najveća vrijednost; Z – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička značajnost

Analiziran je i indeks tjelesne mase kod ispitanica kontrolne i ispitivane skupine. Nije bilo razlike u indeksu tjelesne mase između opisanih skupina ispitanica ($P=0,760$) (Tablica 2). U uzorku su bile ukupno 53 ispitanice s indeksom tjelesne mase 25-29,9 kg/m², te 9 žena s indeksom tjelesne mase većim od 30 kg/m², od čega samo jedna ispitanica s većim od 35 kg/m².

Tablica 2. Indeks tjelesne mase kod ispitanica kontrolne i ispitivane skupine

Varijabla	Skupina ispitanica		Statistička značajnost	
	Kontrolna C (25. P – 75. P)	Ispitivana C (25. P – 75. P)	Z	P
Indeks tj. mase (kg/m ²)	21,8 (20,8-23,4)	21,7 (21,0-22,9)	0,305	0,760

C – medijan; 25. P. – 25. percentila; 75. P. – 75. percentila; Z – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička značajnost

Bolesnice su primale sličnu dozu gonadotropina. Nije postojala statistička razlika u primijenjenoj dozi gonadotropina između kontrolne i ispitivane skupine ispitanica (P=0,447) (Tablica 3).

Tablica 3. Doza gonadotropina u kontrolnoj i ispitivanoj skupini ispitanica

Varijabla	Skupina ispitanica		Statistička značajnost	
	Kontrolna C (25. P – 75. P)	Ispitivana C (25. P – 75. P)	Z	P
Doza gonadotropina (IU)	1800 (1500-2025)	1800 (1500-2156,25)	0,760	0,447

C – medijan; 25. P. – 25. percentila; 75. P. – 75. percentila; Z – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička značajnost

Analizirana je i koncentracija E2 i P4 kod ispitanica kontrolne i ispitivane skupine. Pronađena je značajno veća koncentracija E2 na dan primjene hCG-a u ispitivanoj skupini ispitanica u odnosu na ispitanice u kontrolnoj skupini (P<0,001). Slično tomu, utvrđena je značajno viša koncentracija P4 na dan primjene hCG-a i 5. dana u ispitivanoj skupini u

odnosu na kontrolnu skupinu ispitanica ($P < 0,001$) (Tablica 4). Koncentracije P4 i E2 na dan primjene hCG-a također su bile pozitivno povezane ($r_s = 0,578$; $P < 0,001$). Isto tako, pokazana je pozitivna povezanost koncentracije P4 5. dana ciklusa i koncentracije E2 na dan primjene hCG-a ($r_s = 0,480$; $P < 0,001$). Određena je i srednja vrijednost P4 5. dana kontrolne skupine koja iznosi 315 nmol/L, s obzirom na to da je spomenuta vrijednost diskriminacijska granica na osnovu koje su se ispitanice ispitivane skupine svrstavale za BET ili FET transfer zametaka.

Tablica 4. Koncentracija E2 i P4 kod ispitanica kontrolne i ispitivane skupine

Varijabla	Skupina ispitanica		Statistička značajnost	
	Kontrolna C (25. P – 75. P)	Ispitivana C (25. P – 75. P)	Z	P
Konc. E2 na dan primjene hCG-a	1560,75 (943,06-2200,00)	2850,86 (2285,60-3922,18)	9,722	< 0,001
Konc. P4 na dan primjene hCG-a	2,10 (1,60-2,80)	5,45 (5,20-6,30)	14,986	< 0,001
Konc. P4 5. dana ciklusa	312,35 (253,95-364,50)	312,80 (303,10-485,80)	4,617	< 0,001

C – medijan; 25. P. – 25. percentila; 75. P. – 75. percentila; Z – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička značajnost

Analiziran je broj aspiriranih jajnih stanica, broj oplođenih jajnih stanica i broj transferiranih zametaka između kontrolne i ispitivane skupine (Tablica 5). Ispitanice u ispitivanoj skupini imale su veći broj aspiriranih jajnih stanica, veći broj oplođenih jajnih stanica ($P < 0,001$) i podjednak broj transferiranih zametaka u odnosu na kontrolnu skupinu ($P = 0,631$).

Tablica 5. Broj aspiriranih jajnih stanica, broj oplodjenih jajnih stanica i broj transferiranih zametaka kod ispitanica kontrolne i ispitivane skupine

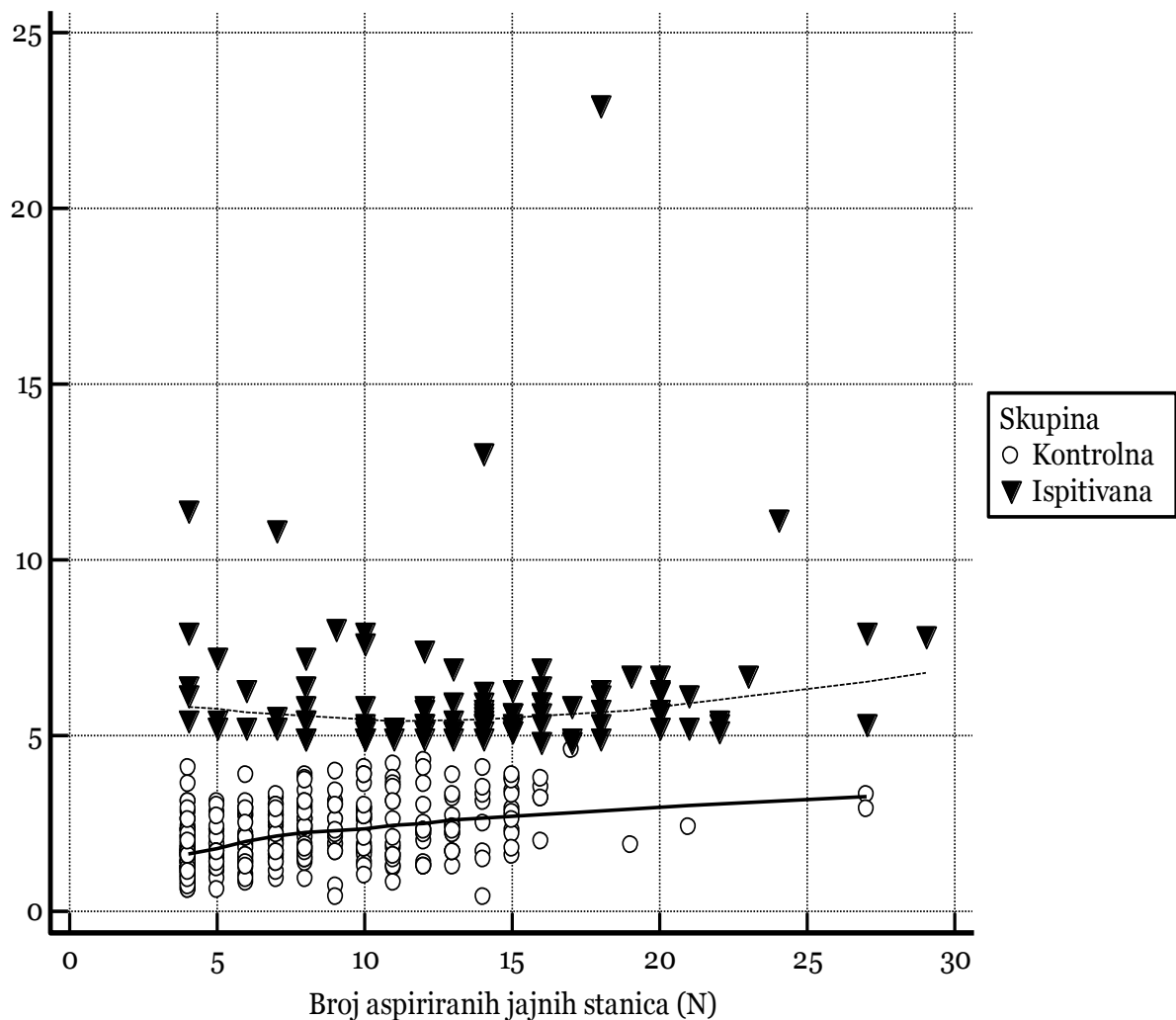
Varijabla	Skupina ispitanica		Statistička značajnost	
	Kontrolna C (25. P – 75. P)	Ispitivana C (25. P – 75. P)	Z	P
Broj aspiriranih jajnih stanica (N)	7 (5-11)	14 (10-17)	8,853	< 0,001
Broj oplodjenih jajnih stanica (N)	5 (3-8)	9,5 (7-12)	7,993	< 0,001
Broj transferiranih zametaka (N)	2 (1-2)	2 (1-2)	0,481	0,631

C – medijan; 25. P. – 25. percentila; 75. P. – 75. percentila; Z – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička značajnost

Analizirana je i povezanost koncentracije P4 na dan primjene hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica. U ukupnome uzorku pronađena je statistički značajna povezanost koncentracije P4 na dan primjene hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica ($r_s=0,540$, $P<0,001$).

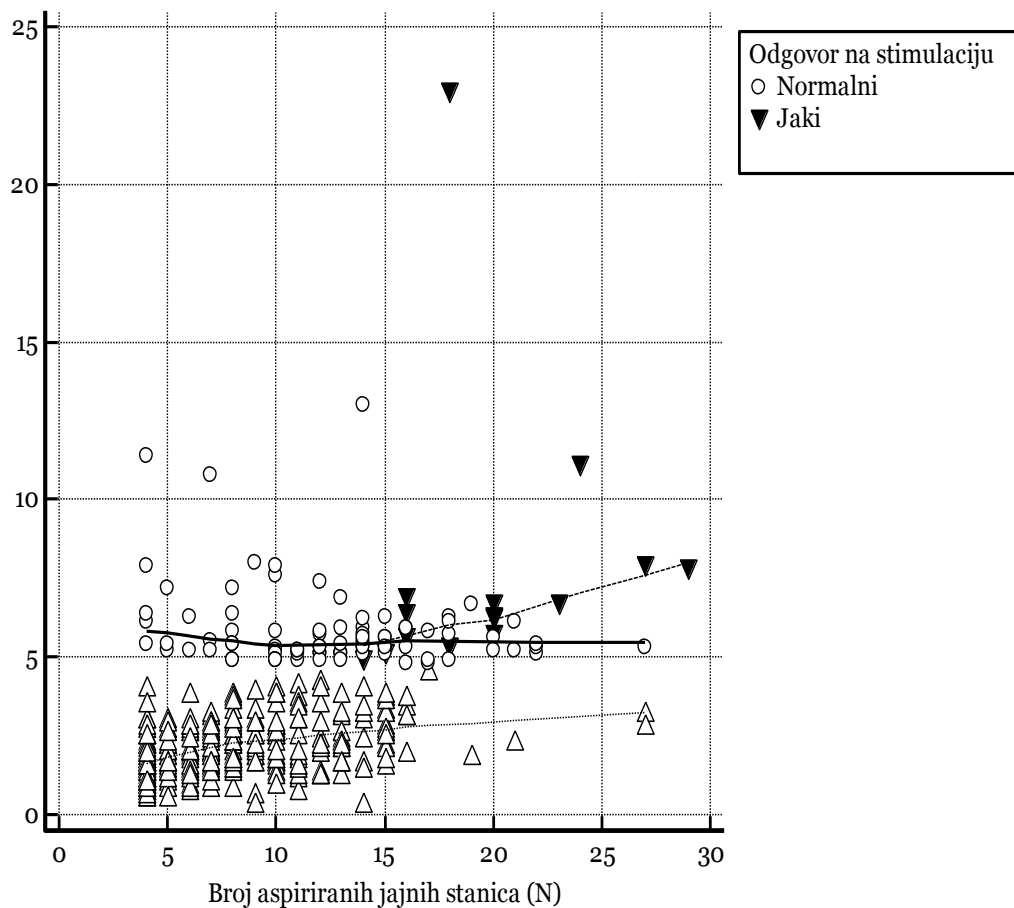
U kontrolnoj skupini koeficijent povezanosti iznosio je $r_s=0,415$; $P<0,001$, dok u ispitivanoj skupini, kada se zajedno promatraju *normal* i *high responderi*, nije nađena povezanost (Grafikon 1). Također, sličan je rezultat pronađen za broj oplodjenih jajnih stanica i koncentraciju P4 na dan primjene hCG-a; u kontrolnoj skupini koeficijent povezanosti iznosio je $r_s=0,360$; $P<0,001$, dok je u ispitivanoj skupini povezanost izostala.

Grafikon 1. Povezanost koncentracije P4 na dan hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica kod svih ispitanica



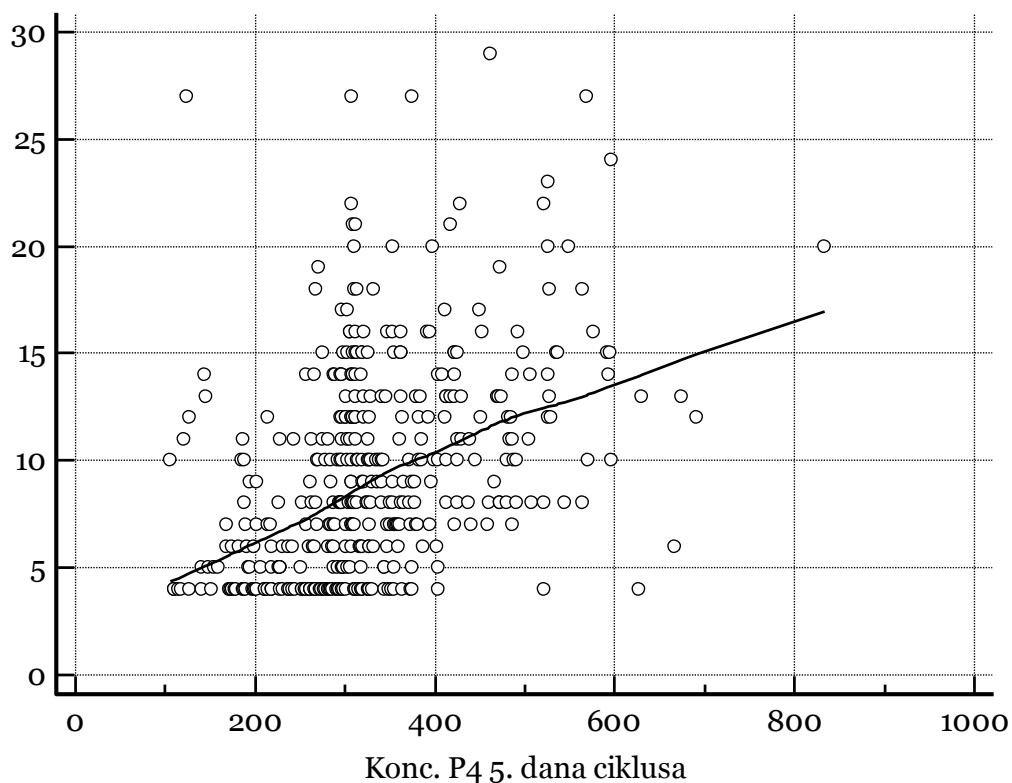
U skupini *normal respondera* nije pronađena statistički značajna povezanost koncentracije P4 na dan primjene hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica ($r_s = -0,140$, $P = 0,202$), dok je u skupini *high respondera* nađena statistički značajna povezanost koncentracije P4 na dan primjene hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica ($r_s = 0,628$, $P = 0,012$) (Grafikon 2).

Grafikon 2. Povezanost koncentracije P4 na dan hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica kod ispitanica ispitivane skupine



Pokazana je statistički značajna povezanost koncentracije P4 5. dana ciklusa i broja aspiriranih jajnih stanica kod svih ispitanica. Što je koncentracija bila veća, to je i broj aspiriranih jajnih stanica bio veći ($r_s=0,455$; $P<0,001$) (Grafikon 3). Nadalje, pronađena je povezanost koncentracije P4 5. dana ciklusa i broja aspiriranih jajnih stanica u skupini *high respondera* ($r_s=0,617$; $P=0,014$).

Grafikon 3. Povezanost koncentracije P4 5. dana ciklusa i broja aspiriranih jajnih stanica kod svih ispitanica



Pronađen je veći omjer koncentracije P4/E2 na dan primjene hCG-a u ispitivanoj skupini bolesnica u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,001$). Isto tako, sličan je rezultat dobiven analizom omjera koncentracije P4 na dan primjene hCG-a/broj aspiriranih jajnih stanica između spomenutih skupina ispitanica ($P < 0,001$) (Tablica 6).

U kontrolnoj skupini ispitanica učinjen je transfer blastociste, dok je u ispitivanoj skupini u 58% slučajeva učinjen transfer blastociste te u preostala 42% transfer krioprezerviranoga zametka, što je statistički znatno različito ($\chi^2 = 140,782$; $P < 0,001$).

Tablica 6. Omjer koncentracija P4/E2 na dan primjene hCG-a i omjer koncentracije P4 na dan primjene hCG-a/broj aspiriranih jajnih stanica kod svih ispitanica

Varijabla	Skupina ispitanica		Statistička značajnost	
	Kontrolna C (25. P – 75. P)	Ispitivana C (25. P – 75. P)	Z	P
Omjer P4/E2 na dan primjene hCG-a	0,430 (0,320-0,595)	0,590 (0,485-0,800)	6,784	< 0,001
Omjer konc. P4 na dan hCG-a/broj jajnih stanica	0,280 (0,195-0,390)	0,420 (0,340-0,610)	8,247	< 0,001

C – medijan; 25. P. – 25. percentila; 75. P. – 75. percentila; Z – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička značajnost

Stopa zanošenja u objema skupinama ispitanica bila je oko jedne trećine od svih učinjenih postupaka. Pacijentice u ispitivanoj skupini imale su diskretno bolju stopu zanošenja u odnosu na kontrolnu skupinu (36,0% prema 34,3%), ali bez statističke značajnosti (P=0,762) (Tablica 7).

Tablica 7. Stopa zanošenja kod ispitanica kontrolne i ispitivane skupine

Skupina		Stopa zanošenja		Ukupno
		Da	Ne	
Kontrolna	N (%)	103 (34,3)	197 (65,7)	300 (100,0)
Ispitivana	N (%)	36 (36,0)	64 (64,0)	100 (100,0)

$$\chi^2=0,092; P=0,762$$

Analiza između kontrolne i ispitivane skupine ispitanica učinjena je i temeljem kliničke stope trudnoća. U Tablici 8 prikazani su rezultati u kliničkoj stopi trudnoća kod ispitanica kontrolne i ispitivane skupine. Pokazalo se da su pacijentice s povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4 imale veću učestalost kliničke stope trudnoća u odnosu na kontrolnu skupinu (32,0% prema 26,0%), ali bez statističke značajnosti (P=0,245).

Tablica 8. Klinička stopa trudnoća kod ispitanica kontrolne i ispitivane skupine

Skupina		Klinička stopa trudnoća		Ukupno
		Da	Ne	
Kontrolna	N (%)	78 (26,0)	222 (74,0)	300 (100,0)
Ispitivana	N (%)	32 (32,0)	68 (68,0)	100 (100,0)

$$\chi^2=1,354; P=0,245$$

S obzirom na životnu dob, nije bilo statistički značajne razlike između *normal respondera* i *high respondera* (P=0,540). U Tablici 9 prikazani su podatci za dob ispitanica.

Tablica 9. Životna dob kod ispitanica ispitivane skupine

Varijabla	Skupina ispitanica		Statistička značajnost	
	<i>Normal responderi</i> C (min.-maks.)	<i>High responderi</i> C (min.-maks.)	Z	P
Dob ispitanica (god.)	34 (30-36)	32 (30-35)	0,612	0,540

C – medijan; min. – najmanja vrijednost; maks. – najveća vrijednost; Z – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička značajnost

Analiziran je i indeks tjelesne mase kod ispitanica ispitivane skupine. Nije bilo razlike u indeksu tjelesne mase između opisanih skupina ispitanica (P=0,209) (Tablica 10).

Tablica 10. Indeks tjelesne mase kod ispitanica ispitivane skupine

Varijabla	Skupina ispitanica		Statistička značajnost	
	<i>Normal responderi</i> C (25. P – 75. P)	<i>High responderi</i> C (25. P – 75. P)	Z	P
Indeks tj. mase (kg/m ²)	21,80 (21,05-23,05)	21,51 (20,90-22,68)	1,255	0,209

C – medijan; 25. P. – 25. percentila; 75. P. – 75. percentila; Z – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička značajnost

Ispitanice su primale sličnu dozu gonadotropina. Nije postojala statistička razlika u primijenjenoj dozi gonadotropina između *normal respondera* i *high respondera* (P=0,486) (Tablica 11).

Tablica 11. Primijenjena doza gonadotropina kod ispitanica ispitivane skupine

Varijabla	Skupina ispitanica		Statistička značajnost	
	<i>Normal responderi</i> C (25. P – 75. P)	<i>High responderi</i> C (25. P – 75. P)	Z	P
Doza gonadotropina (IU)	1800 (1500-2025)	1800 (1200-2100)	0,697	0,486

C – medijan; 25. P. – 25. percentila; 75. P. – 75. percentila; Z – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička značajnost

Analizirane su i koncentracije E2 i P4 kod ispitanica ispitivane skupine. Pronađena je značajno veća koncentracija E2 na dan primjene hCG-a kod *high respondera* u odnosu na *normal respondera* (P<0,001). Isto tako, pronadjen je sličan rezultat za koncentracije P4 na dan primjene hCG-a (P=0,006) i 5. dana ciklusa (P<0,001). Naime, *high responder* ispitanice imale su veću koncentraciju P4 na dan primjene hCG-a te P4 5. dana ciklusa u odnosu na *normal responder* ispitanice (Tablica 12).

Tablica 12. Koncentracija E2 i P4 kod ispitanica ispitivane skupine

Varijabla	Skupina ispitanica		Statistička značajnost	
	<i>Normal responderi</i> C (25. P – 75. P)	<i>High responderi</i> C (25. P – 75. P)	Z	P
Konc. E2 na dan primjene hCG-a	2722,00 (2121,00-3480,00)	4294,70 (3859,58-5862,60)	4,706	< 0,001
Konc. P4 na dan primjene hCG-a	5,40 (5,10-5,90)	6,40 (5,60-7,80)	2,758	0,006
Konc. P4 5. dana ciklusa	311,10 (301,40-472,30)	492,60 (352,90-563,80)	3,697	< 0,001

C – medijan; 25. P. – 25. percentila; 75. P. – 75. percentila; Z – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička značajnost

Analiziran je broj aspiriranih jajnih stanica, broj oplođenih jajnih stanica i broj transferiranih zametaka kod ispitanica ispitivane skupine. *High responder* ispitanice imale su veći broj aspiriranih jajnih stanica ($P < 0,001$), veći broj oplođenih jajnih stanica ($P = 0,006$) i podjednak broj transferiranih zametaka u odnosu na *normal responder* ispitanice ($P = 0,590$) (Tablica 13).

Tablica 13. Broj aspiriranih jajnih stanica, broj oplodjenih jajnih stanica i broj transferiranih zametaka kod ispitanica ispitivane skupine

Varijabla	Skupina ispitanica		Statistička značajnost	
	<i>Normal responderi</i> C (25. P – 75. P)	<i>High responderi</i> C (25. P – 75. P)	Z	P
Broj aspiriranih jajnih stanica (N)	13 (10-15)	20 (16-23)	4,615	< 0,001
Broj oplodjenih jajnih stanica (N)	9 (6-12)	11 (10-12)	2,764	0,006
Broj transferiranih zametaka (N)	2 (1-2)	2 (1-2)	0,540	0,590

C – medijan; 25. P. – 25. percentila; 75. P. – 75. percentila; Z – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička značajnost

Pronađen je veći omjer koncentracije P4/E2 na dan primjene hCG-a kod *normal respondera* u odnosu na *high respondere* ($P < 0,001$). Sličan rezultat dobiven je analizom omjera koncentracije P4 na dan primjene hCG-a/broj aspiriranih jajnih stanica, gdje je kod *normal responder* ispitanica nađen veći omjer u odnosu na *high responder* ispitanice ($P = 0,004$) (Tablica 14).

Tablica 14. Omjer koncentracije P4/E2 na dan primjene hCG-a i omjer koncentracije P4 na dan primjene hCG-a/broj aspiriranih jajnih stanica kod ispitanica ispitivane skupine

Varijabla	Skupina ispitanica		Statistička značajnost	
	<i>Normal responderi</i> C (25. P – 75. P)	<i>High responderi</i> C (25. P – 75. P)	Z	P
Omjer P4/E2 na dan primjene hCG-a	0,62 (0,50-0,84)	0,47 (0,42-0,50)	3,240	< 0,001
Omjer konc. P4 na dan hCG-a/broj jajnih stanica	0,44 (0,36-0,68)	0,34 (0,29-0,40)	2,873	0,004

C – medijan; 25. P. – 25. percentila; 75. P. – 75. percentila; Z – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička značajnost

Analizirana je i stopa zanošenja kod ispitanica ispitivane skupine. *High responder* ispitanice imale su nešto bolju stopu zanošenja u odnosu na *normal responder* ispitanice (40,0% prema 35,3%) ali bez statističke značajnosti (P=0,469) (Tablica 15).

Tablica 15. Stopa zanošenja kod ispitanica ispitivane skupine

Odgovor na stimulaciju		Stopa zanošenja		Ukupno
		Da	Ne	
<i>Normal responderi</i>	N (%)	30 (35,3)	55 (64,7)	85 (100,0)
<i>High responderi</i>	N (%)	6 (40,0)	9 (60,0)	15 (100,0)

$$\chi^2=0,726; P=0,469$$

Također, analizirana je i klinička stopa trudnoća kod ispitanica ispitivane skupine. U Tablici 16 prikazane su kliničke stope trudnoća kod *normal respondera* i *high respondera*. U skupini *high respondera* zabilježena je nešto bolja stopa klinički potvrđenih trudnoća u odnosu na *normal respondere* (40,0% prema 30,6%) ali bez statističke značajnosti (P=0,330).

Tablica 16. Klinička stopa trudnoća kod ispitanica ispitivane skupine

Skupina		Klinička stopa trudnoća		Ukupno
		Da	Ne	
<i>Normal responderi</i>	N (%)	26 (30,6)	59 (69,4)	85 (100,0)
<i>High responderi</i>	N (%)	6 (40,0)	9 (60,0)	15 (100,0)

$$\chi^2=0,471; P=0,330$$

Načinjena je i analiza vrste transfera kod ispitanica ispitivane skupine. U skupini *normal respondera* učinjena su 34 FET postupka (40,0%) pri vrijednosti postovulacijskoga P4 >315 nmol/L te 51 BET postupak pri vrijednosti postovulacijskoga P4 <315 nmol/L (60,0%), dok je u skupini *high respondera* učinjeno 8 (53,3%) FET i 7 (46,7%) BET postupaka randomizacijom (Tablica 17).

Tablica 17. Vrsta transfera kod ispitanica ispitivane skupine

Skupina ispitanica		Vrsta transfera		Ukupno
		FET	BET	
<i>Normal responderi</i>	N (%)	34 (40,0)	51 (60,0)	85 (100,0)
<i>High responderi</i>	N (%)	8 (53,3)	7 (46,7)	15 (100,0)

U Tablici 18 prikazana je, za ispitivanu skupinu ispitanica, stopa zanošenja s obzirom na vrstu transfera. Postojala je statistički značajna razlika tj. zabilježena je veća stopa zanošenja prilikom FET postupka (P=0,032).

Tablica 18. Stopa zanošenja kod ispitanica u ispitivanoj skupini s obzirom na vrstu transfera zametaka

Vrsta transfera		Stopa zanošenja		Ukupno
		Da	Ne	
FET	N (%)	20 (47,6)	22 (52,4)	42 (100,0)
BET	N (%)	16 (27,6)	42 (72,4)	58 (100,0)

FET – transfer smrznutih zametaka; BET – transfer blastociste

$$\chi^2=4,243; P=0,032$$

Načinjena je i analiza kliničke stope trudnoća u ispitivanoj skupini s obzirom na vrstu transfera. Pokazalo se da je veća klinička stopa trudnoća pri FET postupku u odnosu na BET postupak (40,5% prema 25,9%), ali uz marginalnu statističku značajnost (P=0,092) (Tablica 19).

Tablica 19. Klinička stopa trudnoća u ispitivanoj skupini s obzirom na vrstu transfera

Vrsta transfera		Klinička stopa trudnoća		Ukupno
		Da	Ne	
FET	N (%)	17 (40,5)	25 (59,5)	42 (100,0)
BET	N (%)	15 (25,9)	43 (74,1)	58 (100,0)

FET – transfer smrznutih zametaka; BET – transfer blastociste

$$\chi^2=2,391; P=0,092$$

U Tablici 20 prikazana je, za skupinu *normal respondera*, stopa zanošenja s obzirom na vrstu transfera. Postojala je statistički značajna razlika tj. zabilježena je veća stopa zanošenja prilikom FET postupka u odnosu na BET postupak (50,0% prema 25,5%, $\chi^2=5,366$; P=0,019).

Tablica 20. Stopa zanošenja u skupini *normal respondera* s obzirom na vrstu transfera

Vrsta transfera		Stopa zanošenja		Ukupno
		Da	Ne	
FET	N (%)	17 (50,0)	17 (50,0)	34 (100,0)
BET	N (%)	13 (25,5)	38 (74,5)	51 (100,0)

FET – transfer smrznutih zametaka; BET – transfer blastociste

$$\chi^2=5,366; P=0,019$$

Za skupinu *normal respondera* pokazalo se da je veća klinička stopa trudnoća zabilježena pri FET postupku u odnosu na BET postupak (41,2% prema 23,5%) uz marginalnu statističku značajnost (P=0,092) (Tablica 21).

Tablica 21. Klinička stopa trudnoća u skupini *normal respondera* s obzirom na vrstu transfera

Vrsta transfera		Klinička stopa trudnoća		Ukupno
		Da	Ne	
FET	N (%)	14 (41,2)	20 (58,8)	34 (100,0)
BET	N (%)	12 (23,5)	39 (76,5)	51 (100,0)

FET – transfer smrznutih zametaka; BET – transfer blastociste

$$\chi^2=2,391; P=0,092$$

Načinjena je analiza stope zanošenja u skupini *high respondera* s obzirom na vrstu transfera. U Tablici 22 prikazani su rezultati spomenute analize. Pri BET postupku zabilježena je diskretno bolja stopa zanošenja u odnosu na FET postupak (42,9% prema 37,5%), ali bez statističke značajnosti (P=0,622).

Tablica 22. Stopa zanošenja u skupini *high respondera* s obzirom na vrstu transfera

Vrsta transfera		Stopa zanošenja		Ukupno
		Da	Ne	
FET	N (%)	3 (37,5)	5 (62,5)	8 (100,0)
BET	N (%)	3 (42,9)	4 (57,1)	7 (100,0)

FET – transfer smrznutih zametaka; BET – transfer blastociste

$\chi^2=0,045$; $P=0,622$

Za istu skupinu ispitanica nije pokazana (Tablica 23) statistička značajnost ($P=0,622$) u kliničkoj stopi trudnoća s obzirom na vrstu transfera, iako je pri BET postupku zabilježena nešto bolja klinička stopa trudnoća u odnosu na FET postupak (42,9% prema 37,5%).

Tablica 23. Klinička stopa trudnoća u skupini *high repondera* s obzirom na vrstu transfera

Vrsta transfera		Klinička stopa trudnoća		Ukupno
		Da	Ne	
FET	N (%)	3 (37,5)	5 (62,5)	8 (100,0)
BET	N (%)	3 (42,9)	4 (57,1)	7 (100,0)

FET – transfer smrznutih zametaka; BET – transfer blastociste

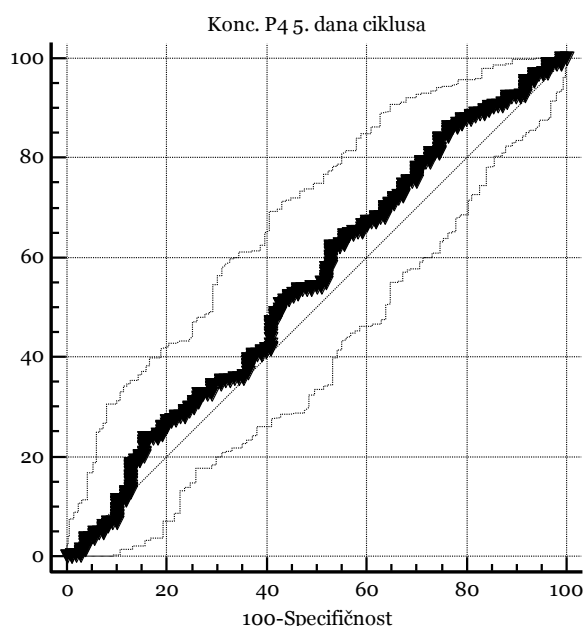
$\chi^2=0,045$; $P=0,622$

Načinjena je i analiza utjecaja P4 5. dana na ishod izvantjelesne oplodnje. Utvrđeno je da vrijednost P4 5. dana u koncentraciji $\leq 425,7$ nmol/L ima visoku osjetljivost (86,21%, 95% CI 81,7-90,0%), a malu specifičnost (23,64%, 95% CI 16,1-32,7%) kod svih ispitanica u postupku izvantjelesne oplodnje, odnosno, da je pri vrijednosti P4 5. dana od $\leq 425,7$ nmol/L visoka osjetljivost da će ispitanica pobaciti, a mala specifičnost (Tablica 24).

Tablica 24. Utjecaj P4 5. dana na ishod izvantjelesne oplodnje kod svih ispitanica

Površina ispod krivulje	0,545
Standardna pogreška	0,0330
95% CI	0,495 do 0,595
Z vrijednost	1,374
P vrijednost	0,1695

Grafikon 4. Utjecaj koncentracije P4 5. dana na ishod izvantjelesne oplodnje kod svih ispitanica



Analiza P4 5. dana sugerira da je P4 5. dana u koncentraciji $\leq 425,7$ nmol/L dobar kao pokazatelj za neuspjeh IVF postupka, ali ako se dogodi neuspjeh, ne bi trebalo promatrati P4 kao odgovornog za neuspjelu trudnoću (Grafikon 4). Dobiveni rezultati pokazuju da bi trebalo težiti vrijednosti P4 5. dana $> 425,7$ nmol/L kod ispitanica u postupku izvantjelesne oplodnje kao potencijalnom zaštitnom čimbeniku za uspješan IVF postupak.

Načinjena je analiza utjecaja P4 5. dana na stopu zanošenja kod ispitanica kontrolne skupine. U kontrolnoj skupini nije pronađena statistički značajna povezanost koncentracije P4 5. dana od $> 193,4$ nmol/L i stope zanošenja (Tablica 25).

Tablica 25. Utjecaj koncentracije P4 5. dana na stopu zanošenja kod ispitanica kontrolne skupine

Površina ispod krivulje	0,515
Standardna pogreška	0,0356
95% CI	0,457 do 0,573
Z vrijednost	0,431
P vrijednost	0,6667

Načinjena je analiza utjecaja P4 5. dana na kliničku stopu trudnoća kod ispitanica kontrolne skupine. U kontrolnoj skupini nije pronađena statistički značajna povezanost koncentracije P4 5. dana od >193,4 nmol/L i kliničke stope trudnoća (Tablica 26).

Tablica 26. Utjecaj koncentracije P4 5. dana na kliničku stopu trudnoća kod ispitanica kontrolne skupine

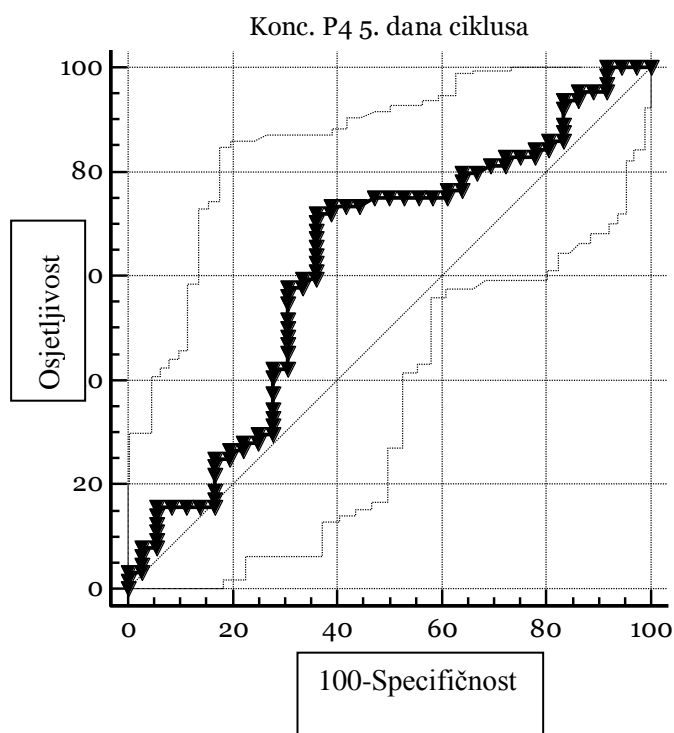
Površina ispod krivulje	0,501
Standardna pogreška	0,0378
95% CI	0,443 do 0,559
Z vrijednost	0,0137
P vrijednost	0,9890

U ispitivanoj skupini učinjena je ROC analiza kako bi se odredio utjecaj koncentracije P4 5. dana ciklusa na stopu zanošenja. U Tablici 27 prikazane su vrijednosti površine ispod krivulje zajedno s vrijednostima statističkoga testa. Najbolji omjer osjetljivosti i specifičnosti testa izmjeren je u koncentraciji P4 5. dana $\leq 384,6$ nmol/L (Grafikon 5). Osjetljivost je pri toj koncentraciji iznosila 71,9% te specifičnost 63,9%.

Tablica 27. Utjecaj koncentracije P4 5. dana na stopu zanošenja kod ispitanica ispitivane skupine

Površina ispod krivulje	0,625
Standardna pogreška	0,061
95% CI	0,522 do 0,719
Z vrijednost	2,050
P vrijednost	0,040

Grafikon 5. Utjecaj koncentracije P4 5. dana na stopu zanošenja kod ispitanica ispitivane skupine



Analizirajući stopu zanošenja i vrijednosti P4 5.dana kod ispitanica ispitivane skupine, utvrđeno je 56,1% slučajeva s pozitivnom stopom zanošenja pri vrijednosti P4 5. dana >384,6 nmol/L u odnosu na 22,0% slučajeva s negativnom stopom zanošenja pri vrijednosti P4 5. dana <384,6 nmol/L. Stoga P4 5. dana >384,6 nmol/L predstavlja zaštitni čimbenik (RR=0,563) za stopu zanošenja, odnosno, rizik da će ispitanica pobaciti manji je ako je P4 5. dana >384,6 nmol/L (Tablica 28).

Tablica 28. Relativni rizik koncentracije P4 5. dana >384,6 nmol/L za stopu zanošenja kod ispitanica ispitivane skupine

			Stopa zanošenja		Ukupno
			Pozitivna	Negativna	
P4 5. dana >384,6 nmol/L	Ne	N (%)	13 (22,0)	46 (78,0)	59 (59,0)
	Da	N (%)	23 (56,1)	18 (43,9)	41 (41,0)

$$\chi^2=12,182; P<0,001$$

$$RR=0,563; Z=3,029; P=0,003$$

P4 5. dana za kliničku stopu trudnoća kod ispitivane skupine nije imao visoku senzitivnost (69,12%, 95% CI 56,7-79,8%) i specifičnost (62,50%, 95% CI 43,7-78,9%) pri vrijednosti P4 5. dana od $\leq 384,6$ nmol/L. To znači da se P4 5. dana kod ispitivane skupine ne može promatrati kao pokazatelj neuspješne ili uspješne kliničke trudnoće pri vrijednosti P4 5. dana od $\leq 384,6$ nmol/L, odnosno, da se za neuspjeh ili uspjeh kliničke trudnoće kod ispitivane skupine ne bi trebao isključivo promatrati P4 (Tablica 29).

Tablica 29. Utjecaj koncentracije P4 5. dana ciklusa na kliničku stopu trudnoća kod ispitanica ispitivane skupine

Površina ispod krivulje	0,614
Standardna pogreška	0,0630
95% CI	0,511 do 0,710
Z vrijednost	1,809
P vrijednost	0,0704

6. RASPRAVA

Svjetska zdravstvena zajednica u posljednjem je desetljeću imala dosta uspjeha u poboljšanju zdravlja majke i djeteta, djelomično usmjeravajući težište svojih istraživanja na reprodukcijsko zdravlje. Neplodnost predstavlja vrlo važan dio reprodukcijškoga zdravlja, ali je često bila zanemarena u ovim istraživanjima. Točan profil prevalencije, distribucije i trendova neplodnosti važan je prvi korak prema definiranju intervencija zasnovanih na dokazima i politika za reduciranje ovoga globalnog problema (102).

Uzroci su neplodnosti višestruki. U 50% slučajeva radi se o problemima kod žena, od čega je u 25% slučajeva uzrok neodgovarajuća proizvodnja jajne stanice (9). Među vodećim uzrocima ženske neplodnosti svakako je i poremećena homeostaza hormona u organizmu. Istraživanje u Italiji, provedeno na 33 000 parova koji su pristupili IVF-u 2007.godine, pokazalo je da su problemi s ovulacijom (PCOS i ciste na jajnicima) uzroci neplodnosti u 5,2% slučajeva (103).

Dosadašnje spoznaje o utjecaju povišenih vrijednosti preovulacijskoga i postovulacijskoga P4 na ishod izvantjelesne oplodnje predmet su mnogobrojnih rasprava u suvremenoj reprodukcijškoj endokrinologiji. Prvi rad o utjecaju povišenog preovulacijskoga P4 objavili su Feldberg i suradnici (104) 1989. godine. Njihovo istraživanje pokazalo je znatno manju stopu implantacije i kliničkih trudnoća u slučaju povišenog preovulacijskoga P4 u odnosu na pacijentice s normalnim vrijednostima. Nadalje, predložili su da cikluse s povišenim preovulacijskim P4 ne bi trebalo otkazivati jer, unatoč tomu, postoji umjerena mogućnost uspješne implantacije i kliničke trudnoće. Mnogobrojna istraživanja, objavljena poslije, govore o nepovoljnu utjecaju povišene razine preovulacijskoga P4 na ishod izvantjelesne oplodnje (74-76). S druge strane, postoje i istraživanja koja dokazuju da ne postoji nepovoljan utjecaj povišene razine preovulacijskoga P4 na ishod izvantjelesne oplodnje (77, 78). Stoga pojava porasta preovulacijskoga P4, kao i vrijednosti P4 u serumu tijekom srednje luteinske faze koje mogu poslužiti kao prediktivni čimbenik za ishod IVF postupka, predstavljaju zagonetku bez jasno formiranih smjernica i strategije pri liječenju takvih bolesnica.

Starija reprodukcijska dob žene postaje sve važnijim čimbenikom neplodnosti suvremenih bračnih parova. Sve više žena zbog promjene načina života, socijalnog i profesionalnog aspekta odlaže svoje majčinstvo prema kasnim tridesetima, s tendencijom ulaska u četrdesete godine svog života. Znanstvenici su dokazali da ženska plodnost svoj maksimum doseže u dobnoj skupini između 20. i 24. godine života, postupno pada do starosti 30-32 godine, a da nakon toga progresivno opada (8). Slični rezultati dobivaju se ako se analiziraju postupci MPO u odnosu na godine žena. Podatci iz Ujedinjenog Kraljevstva za 2007. godinu pokazuju da je stopa uspješnosti IVF postupaka kod pacijentica mlađih od 35 godina 32,3%, dok je kod pacijentica dobne skupine 40-42 godine stopa uspješnosti samo 11,9% (106). Labarta i suradnici (105) analizirali su dob pacijentica s povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4 u odnosu na normalne vrijednosti. Njihovo istraživanje pokazalo je da su ispitanice, koje su imale veće vrijednosti preovulacijskoga P4, bile starije u odnosu na ispitanice s normalnim vrijednostima preovulacijskoga P4 ($27,5 \pm 4,2$ prema $22 \pm 2,2$ godine, $P=0,017$), uz prosječnu starost $24,7 \pm 4,3$ godina. S druge strane, rezultati našega istraživanja pokazali su da nije bilo razlike u odnosu na dob ispitanica ($P=0,096$) uz prosječnu starost od 34 godine u objema skupinama. Nadalje, prilikom analize razlike u dobi između *normal* i *high respondera*, nije se pokazalo da postoji znatna razlika među njima ($P=0,540$), uz prosječnu starost od 34 godine kod *normal respondera* i 32 godine kod *high respondera*. Naši rezultati razlikuju se od rezultata spomenutoga istraživanja. Međutim, prilikom tumačenja ovih rezultata treba uzeti u obzir da je njihovo istraživanje obuhvatilo samo 12 ispitanica; po 6 u kontrolnoj i ispitivanoj skupini, stoga je razumljiva razlika u rezultatima u odnosu na naše istraživanje. Također, u njihovu istraživanju ispitanice u objema skupinama bile su znatno mlađe u odnosu na ispitanice u našem istraživanju, tako da i to može biti razlogom za spomenute razlike u rezultatima.

U našem istraživanju, ispitanice u kontrolnoj i ispitivanoj skupini bile su usklađene i prema ITM-u ($P=0,760$), stimulacijskome protokolu, dozama gonadotropina ($P=0,447$) te broju transferiranih zametaka ($P=0,631$). Analizom ITM-a kod *normal* i *high respondera*, pokazalo se da nije bilo razlike među spomenutim skupinama ispitanica ($P=0,209$). Samo 9 ispitanica imalo je indeks tjelesne mase veći od 30 kg/m^2 , od čega samo jedna ispitanica ITM veći od 35 kg/m^2 . Primijenjena doza gonadotropina i kod *normal* i kod *high respondera*

iznosila je 1800 IJ ($P=0,486$), a obje skupine bile su usklađene i prema broju transferiranih zametaka ($P=0,590$).

Tijekom reproduktivnog razdoblja E2 produciraju uglavnom granulosa stanice kroz proces aromatizacije androstendiona u estron. Ovaj proces važan je za pripremu sluznice maternice, implantaciju blastociste i progesteronsku pripremu endometrija. Zbog toga je mjerenje vršne vrijednosti E2 na dan primjene hCG-a integralna sastavnica procjene odgovora jajnika na stimulaciju (107). Istraživanja su pokazala da, kako niske vrijednosti E2 (500 pg/mL), tako i visoke ($>4,000$ pg/mL) na dan hCG-a rezultiraju u niskom, odnosno visokom broju aspiriranih jajnih stanica, a samim time i na smanjenje mogućnosti za realizaciju trudnoće. Povišene ili snižene vrijednosti E2 dovode do poremećene maturacije citoplazme jajnih stanica čime, u konačnici, smanjuju stopu zanošenja i kliničku stopu trudnoća (108). Također, povišene vrijednosti E2 u serumu izravno su povezane s povećanim brojem folikula, a, prema nekim istraživanjima, i s prijevremenim porastom preovulacijskoga P4 (109). Naše istraživanje je pokazalo da su vrijednosti E2 na dan primjene hCG-a bile znatno veće kod ispitanica s povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4 ($P<0,001$) (Tablica 4), a pronađena je i pozitivna povezanost između koncentracija P4 i E2 na dan primjene hCG-a ($r_s=0,578$; $P<0,001$). Requena i suradnici (80) našli su, također, pozitivnu povezanost između koncentracija P4 i E2 na dan primjene hCG-a; vrijednosti E2 pratile su porast vrijednosti P4 ($P<0,001$). Slični rezultati su se, u našem istraživanju, dobili i kada se ispitivana skupina analizirala prema odgovoru na stimulaciju (*normal responderi* prema *high responderima*). Nađena je značajno veća koncentracija E2 na dan primjene hCG-a kod *high respodera* u odnosu na *normal respondere* ($P<0,001$) (Tablica 12).

Posljednjih godina aktualizirao se, u znanstvenoj literaturi, omjer P4 i E2 na dan primjene hCG-a, s obzirom na to da je receptivnost endometrija određena kompleksnim interakcijama P4 i E2. Younis i suradnici (110) pronašli su da je omjer P4/E2 precizniji u otkrivanju slabe rezerve jajnika i manjeg broja dobivenih jajnih stanica prilikom aspiracije, a isto je potvrdilo i nedavno objavljeno istraživanje Aurore i suradnika (111). S druge strane, postoje i istraživanja koja pokazuju da povećanje omjera P4/E2 rezultira većim brojem dobivenih jajnih stanica i da ne utječe negativno na stopu trudnoća kod normo-ovulatornih pacijentica (76, 112). Naše istraživanje potvrdilo je rezultate potonjih studija jer se pokazalo

da je omjer P4/E2 veći kod ispitanica s povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4 u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanica (0,590 prema 0,430, $P < 0,001$) (Tablica 6). Kada se ispitivana skupina podijelila na *normal* i *high respondera*, pokazalo se da je omjer P4/E2 veći u skupini *normal respondera* (0,620 prema 0,470, $P < 0,001$) (Tablica 14). Analiziran je i omjer koncentracije P4 na dan hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica. Pronađen je veći omjer koncentracije P4 na dan primjene hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica kod ispitanice u odnosu na kontrolnu skupinu (0,420 prema 0,280, $P < 0,001$) (Tablica 6). Isti rezultat dobiven je analizom *normal* i *high respondera*; veći omjer koncentracije P4 na dan primjene hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica nađen je kod *normal respondera* u odnosu na *high respondera* (0,440 prema 0,340, $P = 0,004$) (Tablica 14). Neki autori otišli su čak i dalje i analizirali utjecaj omjera koncentracije P4 na dan primjene hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica na ishod IVF postupka. Rezultati su ovih istraživanja suprotstavljeni. Istraživanje Aflatooniana i suradnika (113) pronašlo je da apsolutna vrijednost preovulacijskoga P4 i omjer P4/E2 nisu dobar predskazatelj ishoda IVF postupka. Nadalje, omjer P4 prema broju jajnih stanica u metafazi II pokazao se prediktivnim na stopu implantacije i stopu trudnoća, ali nije imao utjecaja na stopu oplodnje (113). Singh i suradnici (114) pokazali su da omjer P4/broj jajnih stanica na dan hCG-a može biti koristan u predviđanju rezultata IVF postupka u odnosu samo na vrijednosti P4. S druge strane, nedavno provedeno istraživanje Hilla i suradnika (115) nije dokazalo prednost uporabe omjera P4/broj jajnih stanica na dan hCG-a kao predskazatelja ishoda IVF postupka u odnosu, bilo vrijednosti preovulacijskoga P4, bilo broja aspiriranih jajnih stanica na dan hCG-a, na ishod IVF postupka.

Prilikom analize broja aspiriranih stanica, broja oplođenih jajnih stanica te broja transferiranih zametaka između kontrolne i ispitivane skupine, u našem istraživanju pokazalo se da su ispitanice u ispitivanoj skupini imale veći broj aspiriranih jajnih stanica, veći broj oplođenih jajnih stanica ($P < 0,001$) i podjednak broj transferiranih zametaka u odnosu na kontrolnu skupinu ($P = 0,631$) (Tablica 5). *High responder* ispitanice imale su veći broj aspiriranih jajnih stanica ($P < 0,001$), veći broj oplođenih jajnih stanica ($P = 0,006$) i podjednak broj transferiranih zametaka u odnosu na *normal responder* ispitanice ($P = 0,590$). Nadalje, pronađena je statistički značajna povezanost koncentracije P4 na dan primjene hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica u ukupnome uzorku ($r_s = 0,540$, $P < 0,001$). U kontrolnoj skupini

koeficijent povezanosti iznosio je $r_s=0,415$; $P<0,001$, dok u ispitivanoj skupini, kada se zajedno promatraju *normal* i *high responderi*, nije nađena povezanost. Kada se odvojeno analiziraju *normal* i *high responderi*, pronađena je statistički značajna povezanost koncentracije P4 na dan primjene hCG-a i broja aspiriranih jajnih stanica ($r_s=0,628$, $P=0,012$) kod *high respondera*, dok je izostala povezanost kod *normal respondera* ($r_s=-0,140$, $P=0,202$). Pokazana je statistički značajna povezanost koncentracije P4 5. dana ciklusa i broja aspiriranih jajnih stanica kod svih ispitanica. Što je koncentracija bila veća, to je i broj aspiriranih jajnih stanica bio veći ($r_s=0,455$; $P<0,001$), a isto se pokazalo i u skupini *high respondera* ($r_s=0,617$; $P=0,014$). Li i suradnici (116) su, u nedavno provedenu istraživanju, pronašli da je broj aspiriranih jajnih stanica bio veći u pacijentica s povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4. Iste rezultate dobili su i Bosch i suradnici (117); broj aspiriranih jajnih stanica bio je veći kod pacijentica s povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4 u odnosu na pacijentice s normalnim vrijednostima ($P<0,0001$). Analizirali su i povezanost vrijednosti E2 i P4 na dan hCG-a u slučajevima povišenih vrijednosti preovulacijskoga P4, te su, također, dokazali povezanost između vrijednosti E2 i P4; veće vrijednosti E2 registrirale su se s povećanjem preovulacijskoga P4 ($P<0,0001$). Nekoliko istraživanja bavilo se i potencijalnim štetnim utjecajem povišenih vrijednosti preovulacijskoga P4 na kvalitetu aspiriranih jajnih stanica te kvalitetu zametaka. Pokazalo se da povišene vrijednosti preovulacijskoga P4 djeluju samo na receptivnost endometrija, mijenjajući „implantacijski prozor“, a da ne utječu na kvalitetu zametaka (118). Naše istraživanje pokazalo je da je veći broj oplođenih jajnih stanica od ukupnog broja aspiriranih bio kod kontrolne skupine u odnosu na ispitanu skupinu pacijentica (5 oplođenih u odnosu na 7 aspiriranih u prosjeku kod kontrolne skupine, odnosno 9,5 oplođenih u odnosu na 14 aspiriranih kod ispitanu skupine). Slični rezultati dobiveni su i prilikom analize *normal* i *high respondera*; veći broj oplođenih jajnih stanica od ukupnog broja aspiriranih, bio je kod *normal respondera* u odnosu na *high respondere* (9 oplođenih u odnosu na 13 aspiriranih u prosjeku kod *normal respondera*, odnosno 11 oplođenih u odnosu na 20 aspiriranih kod *high respondera*). Ovi rezultati su, suprotno prethodno spomenutom istraživanju, ipak indirektno pokazali da povišene vrijednosti preovulacijskoga P4 mogu imati i potencijalno štetan učinak na kvalitetu oplođenih jajnih stanica, jer je veći broj oplođenih stanica registriran u skupini s normalnim vrijednostima P4. Naše rezultate potvrdili su Huang i suradnici (119) koji su, u analizi 4236 IVF ciklusa, jasno pokazali negativan učinak povišenih vrijednosti P4 na dan hCG-a na

kvalitetu zametaka, bez obzira na bazalne vrijednosti FSH, ukupnu dozu gonadotropina, starost žena ili vrijeme stimulacije jajnika. S druge strane, Griesinger (79) i Requena (80) nisu pronašli negativan učinak povišenih vrijednosti preovulacijskoga P4 na kvalitetu niti jajnih stanica, niti zametaka, što je suprotno rezultatima našega istraživanja.

P4 ima ključnu ulogu tijekom luteinske faze menstruacijskoga ciklusa, a posebno je važan za implantaciju zametka i napredak trudnoće. Međutim, u kontekstu stimuliranih ciklusa, njegova potencijalno štetna uloga tijekom folikularne faze bila je u fokusu interesa mnogih znanstvenika i predmet kontroverzija posljednjih godina. Povišene vrijednosti P4 tijekom kasne folikularne faze vjerojatno utječu na sekrecijske promjene endometrija, što rezultira poremećenom receptivnosti endometrija. S druge strane, pacijentice koje adekvatno odgovore na COH vjerojatnije će producirati bolje jajne stanice. Stoga će posljedice povišenih vrijednosti preovulacijskoga P4 na klinički ishod trudnoće pacijentica s dobrim odgovorom na stimulaciju ovisiti o balansu 2 antagonističkih čimbenika: vjerojatnosti dobivanja više jajnih stanica s dobrim odgovorom jajnika i poremećenoj receptivnosti endometrija, što je uvjetovano prijevremenom izlaganju endometrija progesteronu (80). Sonigo i suradnici (118) su, u svome preglednom članku, analizirali mnogobrojna istraživanja o ovoj temi i pronašli suprotstavljene stavove. Jedna skupina znanstvenika tvrdi da ne postoji negativan učinak povišenih vrijednosti preovulacijskoga P4 na ishod IVF postupka, dok drugi tvrde potpuno suprotno, odnosno, da postoji negativan učinak. Velika meta-analiza Venetisa i suradnika (76) s više od 60 000 ciklusa pokazala je da su povišene vrijednosti preovulacijskoga P4 povezane s nižom stopom trudnoća. S druge strane, Huang i suradnici (120) pokazali su da povišen preovulacijski P4 ne šteti kliničkome ishodu IVF postupka. Requena i suradnici (80) pokazali su da postoji marginalna statistička značajnost vezana uz utjecaj preovulacijskoga P4 na stopu zanošenja, i to kod vrijednosti $P4 > 5,7 \text{ nmol/L}$ ($P=0,045$) te na kliničku stopu trudnoća pri istoj vrijednosti P4 ($P=0,048$) u kontekstu jakog odgovora jajnika na stimulaciju. Međutim, daljnja analiza njihovih rezultata nije pokazala negativan učinak povišenih vrijednosti preovulacijskoga P4 na ishod IVF postupka kod *high respondera*. Naše istraživanje zabilježilo je slične rezultate. Stopa zanošenja bila je oko jedne trećine od svih učinjenih postupaka, uz diskretno bolje rezultate kod ispitivane skupine (36,0% kod ispitivane skupine prema 34,3% kod kontrolne skupine, $\chi^2=0,092$; $P=0,762$), ali bez statističke značajnosti (Tablica 7). Isti rezultat dobiven je i prilikom analize stope

zanošenja kod *normal* i *high respondera*; stopa zanošenja bila je oko jedne trećine i kod jedne i kod druge skupine ispitanica uz nešto bolju stopu zanošenja kod *high respondera* (40,0% kod *high respondera* prema 35,3% kod *normal respondera*, $\chi^2=0,726$; $P=0,469$), ali bez statističke značajnosti. Naši rezultati, praktički, pokazuju da se povišene vrijednosti preovulacijskoga P4 čak i nešto povoljnije odražavaju na stopu zanošenja u odnosu na normalne vrijednosti preovulacijskoga P4. Nadalje, pokazali smo da *high responder* ispitanice imaju bolju stopu zanošenja u odnosu na *normal responder* ispitanice, čime smo potvrdili istraživanje Griesingera i suradnika (79), koji su pokazali da su vrijednosti preovulacijskoga P4 > 4,77 nmol/L bile povezane s nižom stopom trudnoća kod *poor* i *normal respondera*, ali da nisu utjecale na stopu trudnoća kod *high respondera*. Sukladno pretpostavci o negativnom učinku povišenog preovulacijskoga P4, analizirao se i utjecaj vrste transfera (FET-transfer krioprezerviranih zametaka ili BET-transfer blastociste) na ishod IVF postupka. Corti i suradnici (121) pokazali su da se transferom blastociste ne može u potpunosti prevladati štetan učinak povišenih vrijednosti P4 na dan hCG-a na ishod IVF postupka. Međutim, Papanikolaou i suradnici (86) izvještavaju o boljem uspjehu IVF postupka pri transferu blastociste u odnosu na transfer zametaka 3. dana. Njihovo mišljenje dijele Huang i suradnici (120) koji su, također, pokazali da bi transfer blastociste mogao poboljšati ishod pri povišenim vrijednostima P4 na dan hCG-a. Yang i suradnici (122) objavili su prvo i jedino prospektivno kliničko istraživanje koje je uspoređivalo transfer krioprezerviranih zametaka s transferom blastociste. FET ciklusi imali su usporedivu stopu živorođene djece s transferom blastociste (38,1% prema 13,9%) pri vrijednosti preovulacijskoga P4=6 nmol/L, a ovakav rezultat vjerojatno je uvjetovan malim uzorkom u istraživanju. S druge strane, Healy i suradnici (123) pokazali su da je povišen P4 na dan hCG-a negativno povezan sa stopom živorođene djece pri transferu blastociste, ali ne i pri FET postupku. Krioprezervacija zametaka i FET transfer u prirodnome ciklusu povećava stopu živorođene djece u slučajevima povišenog preovulacijskoga P4. Njihovo mišljenje dijele i Wong i suradnici (124), koji predlažu krioprezervaciju svih zametaka, bez transfera blastociste, za optimizaciju uspjeha IVF postupka. U našem istraživanju, u ispitivanoj skupini pacijentica postojao je veći udio pozitivne stope zanošenja prilikom FET postupka (47,6% prema 27,6%, $\chi^2=4,243$; $P=0,032$). Nadalje, u skupini *normal respondera* zabilježena je statistički značajna razlika u učestalosti pozitivne stope zanošenja u ovisnosti o vrsti transfera (50,0% kod FET postupka odnosno 25,5% kod BET postupka, $\chi^2=5,366$; $P=0,019$), za razliku

od *high respondera* kod kojih je bolja stopa zanošenja zabilježena pri BET postupku (42,9% kod BET postupka prema 37,5% kod FET postupka, $\chi^2=0,045$; $P=0,622$), ali bez statističke značajnosti. Pokazano je da se BET postupak kod *normal respondera* uz povišen postovulacijski P4 (>315 nmol/L) nepovoljno odražava na ishod trudnoće, stoga bi se stopa zanošenja mogla poboljšati primjenom FET postupka. S druge strane, to ne važi za *high respondere*, gdje je bolja stopa zanošenja zabilježena pri BET postupku, čime smo potvrdili istraživanje Griesingera i suradnika (79). Iz rezultata našega istraživanja može se zaključiti da bi se, u situacijama povišenog preovulacijskoga P4, trebala razmotriti krioprezervacija svih zametaka i naknadni transfer u prirodnome ciklusu. Na taj način poboljšao bi se ishod IVF postupka kod *normal respondera*, dok bi se kod *high respondera*, uglavnom spriječila najčešća komplikacija COH-a, a to je OHSS, premda uz nešto nepovoljniju stopu zanošenja.

Analizirana je i klinička stopa trudnoća u kontrolnoj i ispitivanoj skupini. U objema skupinama ispitanica ukupni postotak kliničke stope trudnoća bio je oko jedne trećine od svih učinjenih postupaka, premda uz nešto bolji rezultat kod ispitivane skupine, ali bez statističke značajnosti (32,0% kod ispitivane skupine prema 26,0% kod kontrolne skupine, $\chi^2=1,354$; $P=0,245$), a isti rezultat dobio se i prilikom analize *normal* i *high respondera* (40,0% kod *high respondera* prema 30,6% kod *normal respondera*, $\chi^2=0,471$; $P=0,330$). Pokazana je, za ispitivanu skupinu, marginalna statistička značajnost u udjelu kliničke stope trudnoća s obzirom na vrstu transfera (40,5% kod FET postupka prema 25,9% kod BET postupka, $\chi^2=2,391$; $P=0,092$). Za skupinu *normal respondera* također je pokazana marginalna statistička značajnost u udjelu kliničke stope trudnoća s obzirom na vrstu transfera (41,2% kod FET postupka prema 23,5% kod BET postupka, $\chi^2=2,391$; $P=0,092$), a isto se pokazalo i za skupinu *high respondera* (42,9% kod BET postupka prema 37,5% kod FET postupka, $\chi^2=0,045$; $P=0,622$). Kao što pokazuju naši rezultati, povišene vrijednosti preovulacijskoga P4 imaju čak i povoljniji utjecaj na kliničku stopu trudnoća u odnosu na normalne vrijednosti preovulacijskoga P4. To praktički znači da, ako se i dogodi biokemijska trudnoća ili rani pobačaj kod ispitanica s povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4, ne bi se trebalo promatrati kroz prizmu P4 na dan hCG-a, nego postoji i niz drugih čimbenika kod pacijentica koji bi mogli utjecati na ovakav ishod. Međutim, kada se u obzir uzme i vrsta transfera, rezultati kod *normal* i *high respondera* različiti su. Zašto je bolja klinička stopa trudnoća kod *high respondera*, u literaturi još nije jasno. Pretpostavlja se da postoje neki čimbenici u ovoj

skupini ispitanica zbog kojih je ishod IVF-a uz BET postupak bolji. Ti čimbenici potencijalno uključuju receptivnost endometrija i kvalitetu jajnih stanica i zametaka, iako ove pretpostavke treba potvrditi prospektivnim randomiziranim istraživanjima (79). S druge strane, najnovije istraživanje Lawrenza i suradnika (125) pokazalo je da povišene vrijednosti preovulacijskoga P4 imaju negativni učinak na ishod IVF postupka, kako na stopu zanošenja, tako i na kliničku stopu trudnoća.

Kliničko značenje P4 tijekom luteinske faze u predviđanju ishoda trudnoće nakon COH-a još je neadekvatno istraženo. Poznato je da opstanak žutog tijela 7-8 dana nakon aspiracije jajnih stanica može biti rani dijagnostički biljeg trudnoće. Također, P4 se katkad označava i hormonom trudnoće s obzirom na njegovu ulogu u implantaciji i održavanju trudnoće. Istraživanje Gumaee i suradnika (93) pokazalo je značajno veće vrijednosti P4 u serumu trudnih pacijentica u odnosu na one pacijentice kod kojih nije registrirana trudnoća, kako u ranoj luteinskoj fazi, tako i u kasnoj. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja P4 tijekom rane trudnoće uključuje pripremu endometrija posredstvom E2 te smanjenje kontraktilnosti glatke muskulature maternice. Ove navode potvrdio je i Fanchin 2001. godine (126), koji je pokazao da kontrakcije maternice na dan transfera zametaka imaju negativan učinak na ishod samoga transfera. Nađena je i negativna povezanost između frekvencije kontrakcija maternice i vrijednosti P4 u serumu, čime je naglašena važnost P4 u IVF postupcima (93). Brady i suradnici našli su pozitivnu povezanost vrijednosti P4 na dan transfera sa stopom kliničkih trudnoća i stopom živorođene djece. Nadalje, pokazali su i da je povećanje doze P4 nakon transfera bilo dovoljno za poboljšanje ishoda (95). Zbog ograničenog broja istraživanja u vezi s utjecajem P4 5. dana na ishod IVF postupka, u našem istraživanju analizirali smo i taj parametar. Pokazali smo da P4 5. dana na cjelokupni ishod izvantjelesne oplodnje kod svih ispitanica ima visoku osjetljivost (86,21%, 95% CI 81,7-90,0%), a malu specifičnost (23,64%, 95% CI 16,1-32,7%) pri vrijednosti P4 5. dana od $\leq 425,7$ nmol/L ($P=0,1695$). U kliničkome smislu to znači da je P4 5. dana dobar kao biljeg za neuspjeh IVF postupka, ali ako se dogodi neuspjeh, ne bi trebalo promatrati P4 kao odgovornog za neuspjelu trudnoću. Naime, poznata je činjenica da, uz P4, mnogobrojni čimbenici kao što su hormonalni disbalans, poremećaj koagulabilnosti te infekcije mogu utjecati na ishod IVF-a (127, 128), te da kroz prizmu toga treba promatrati i naše rezultate. Ako se odvojeno promatra kontrolna skupina ($P4 < 4,77$ nmol/L), nije se pokazala statistički

značajna povezanost koncentracije P4 5. dana od $>193,4$ nmol/L i stope zanošenja ($P=0,6667$), odnosno, kliničke stope trudnoće ($P=0,9890$).

S druge strane, u ispitivanoj skupini ($P4 > 4,77$ nmol/L) učinjena je ROC analiza kako bi se odredio prediktivni utjecaj koncentracije P4 5. dana ciklusa na stopu zanošenja. Najbolji omjer osjetljivosti i specifičnosti testa izmjeren je u koncentraciji P4 5. dana $\leq 384,6$ nmol/L. Osjetljivost je pri toj koncentraciji iznosila 71,9% te specifičnost 63,9% ($P=0,040$). Analizirajući ispitanice s pozitivnom stopom zanošenja i vrijednostima P4 5. dana, utvrđeno je 56,1% pozitivne stope zanošenja pri vrijednosti P4 5. dana $>384,6$ nmol/L u odnosu na 22,0% negativne stope zanošenja pri vrijednosti P4 5. dana $<384,6$ nmol/L. Stoga P4 5. dana $>384,6$ nmol/L predstavlja zaštitni čimbenik ($RR=0,563$) trudnoće, odnosno, rizik da će ispitanica pobaciti manji je ako je P4 5. dana $>384,6$ nmol/L. Nije se pokazala visoka senzitivnost (69,12%, 95% CI 56,7-79,8%) i specifičnost (62,50%, 95% CI 43,7-78,9%) glede utjecaja P4 5. dana od $\leq 384,6$ nmol/L na kliničku stopu trudnoće kod ispitanice skupine. Naši rezultati pokazali su da, ako ne uzimamo u obzir vrijednost preovulacijskoga P4 kod IVF postupka, treba težiti vrijednosti P4 5. dana od $>425,7$ nmol/L kao potencijalno dobrom biljevu uspješne stope zanošenja. Slično tomu treba težiti i ako pacijentica ima normalne vrijednosti P4 na dan hCG-a, međutim, ako pacijentica ima povišene vrijednosti preovulacijskoga P4, vrijednost postovulacijskoga P4 trebala bi biti $>384,6$ nmol/L, s obzirom na to da smo dokazali kako ova vrijednost može biti zaštitni čimbenik trudnoće. Sukladno dobivenim rezultatima, trebalo bi i prilagoditi lutealnu potporu u razdoblju nakon transfera zametaka, a u cilju smanjenja broja neuspjelih IVF pokušaja, kako kod pacijentica s normalnim, tako i kod pacijentica s povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4. Drugim riječima, trebalo bi individualizirati i stimulacijske protokole i lutealnu potporu svake pacijentice.

Naši rezultati upućuju da povišene vrijednosti preovulacijskoga P4 nemaju negativan učinak na stopu zanošenja i kliničku stopu trudnoća, nego da imaju čak i blagi protektivni učinak, s obzirom na nešto bolji ishod IVF postupka kod ispitanice u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanica. Nadalje, u slučajevima povišenog preovulacijskoga P4, diskretno bolja stopa zanošenja i klinička stopa trudnoća zabilježena je kod *high respondera* u odnosu na *normal respondera*. Također, dokazali smo da je bolja stopa zanošenja registrirana pri FET

transferu u odnosu na BET transfer kod pacijentica s povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4, što znači da bi se, ipak, u tim situacijama trebala razmotriti krioprezervacija svih zametaka i naknadni transfer u prirodnome ciklusu. To posebice važi za skupinu *normal respondera*, dok je kod *high respondera* zabilježena nešto bolja stopa zanošenja i kliničke stope trudnoća pri BET postupku. Međutim, i kod *high respondera* trebalo bi primjenjivati strategiju krioprezervacije zametaka čak i uz nešto nepovoljniji ishod IVF postupka, jer se na taj način sprječava razvoj OHSS-a, koji je jedna od najčešćih komplikacija COH-a. U konačnici, kada se promatra P4 5. dana kod ispitanica s normalnim vrijednostima preovulacijskoga P4, trebalo bi težiti vrijednostima $>425,7$ nmol/L kao potencijalnom biljegu uspješne stope zanošenja, a u većini slučajeva i bolje kliničke stope trudnoća. S druge strane, ako se radi o ispitanicama s povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4, vrijednost P4 na dan transfera zametaka trebala bi biti $>384,6$ nmol/L za uspješan IVF postupak. Buduća istraživanja pokazati će imaju li spomenute strategije za poboljšanje ishoda IVF postupka kod povišenih vrijednosti preovulacijskoga P4 rezultata te u kojoj je mjeri individualizacija lutealne potpore nakon transfera zametaka polučila uspjeh.

7. ZAKLJUČAK

- Povišene vrijednosti preovulacijskoga P4 ($>4,77$ nmol/L) kod svih ispitanica ispitivane skupine nakon stimulacije ovulacije u IVF postupku nemaju nepovoljan utjecaj na uspješnost postupka promatrano kroz stopu zanošenja i kliničku stopu trudnoća. Slično tome, povišene vrijednosti postovulacijskoga P4 (>315 nmol/L) u ispitivanoj skupini nemaju nepovoljan utjecaj na ishod IVF trudnoće kod *normal respondera* s krioprezervacijom/odmrzavanjem blastocista i transferom u prirodnom ciklusu, te kod svih *high respondera* s transferom svježih (BET) ili krioprezerviranih/odmrznutih zametaka;
- Unatoč povišene vrijednosti preovulacijskoga P4 ($>4,77$ nmol/L) kod ispitanica ispitivane skupine izostaje neopovoljan utjecaj na ishod trudnoće nakon IVF postupka u odnosu na ispitanice kontrolne skupine s nižim koncentracijama preovulacijskog P4 ($<4,77$ nmol/L);
- U ispitivanoj skupini ispitanica s povišenim preovulacijskim P4 ($>4,77$ nmol/L) bolji je ishod trudnoće kod *normal respondera* s višim koncentracijama postovulacijskoga P4 (>315 nmol/L) u kojih je nakon krioprezerviranja/odmrzavanja učinjen transfer blastocista u prirodnom ciklusu, u odnosu na *normal respondere* s nižim koncentracijama postovulacijskoga P4 (<315 nmol/L) kod kojih je u istom ciklusu učinjen transfer svježih blastocista (BET);
- U ispitivanoj skupini ispitanica s randomiziranim transferom zametaka kod *high respondera* s povišenim vrijednostima preovulacijskog P4 ($>4,77$ nmol/L) i postovulacijskog P4 (>315 nmol/L), uspješnost IVF postupka je izraženija u slučajevima transfera svježih blastocista u istom ciklusu (BET), u odnosu na krioprezerviranje/odmrzavanje zametaka i transfer u prirodnom ciklusu;

- Vrijednosti P4 5.dana $>425,7$ nmol/L predstavljaju potencijalni biljeg više stope zanošenja, a u većini slučajeva i više kliničke stope trudnoća pri normalnim vrijednostima preovulacijskoga P4 ($<4,77$ nmol/L);
- Vrijednosti P4 5.dana $>384,6$ nmol/L predstavljaju potencijalni biljeg više stope zanošenja, a u većini slučajeva i više kliničke stope trudnoća pri povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4 ($>4,77$ nmol/L);
- Individualizacija stimulacijskih protokola te lutealne potpore nakon transfera zametaka trebale bi poboljšati ishod IVF postupaka.

8. SAŽETAK

Svrha: Ispitati utjecaj povišenog preovulacijskoga i postovulacijskoga progesterona (P4) na ishod izvantjelesne oplodnje.

Materijali i metode: Ovo je prospektivno kohortno istraživanje koje je uključilo 400 ispitanica (300 u kontrolnoj skupini i 100 u skupini s povišenim preovulacijskim P4 - 85 *normal respondera* i 15 *high respondera*). Uspoređen je ishod IVF postupka kod ispitanica s normalnim vrijednostima P4 u odnosu na ispitanice s povišenim preovulacijskim P4, ishod IVF postupka kod *normal* i *high respondera*, utjecaj vrste transfera (BET ili FET) kod ispitanica s povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4 na ishod IVF postupka, te utjecaj postovulacijskoga P4 na ishod IVF postupka.

Rezultati: Pozitivan ishod IVF postupka zabilježen je u oko jedne trećine od svih učinjenih postupaka kod kontrolne i ispitivane skupine, uz nešto bolji ishod pri povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4. Kod *normal respondera* bolji je ishod pri FET transferu, dok je kod *high respondera* nešto bolji uspjeh pri BET transferu. Bolji ishod IVF-a zabilježen je pri vrijednosti P4 5. dana $>425,7$ nmol/L kod svih ispitanica, odnosno pri vrijednosti P4 5. dana $>384,6$ nmol/L kod ispitanica s povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4.

Zaključak: Povišene vrijednosti preovulacijskoga P4 imaju blagi protektivni utjecaj na ishod IVF postupka, dok bi vrijednosti P4 5. dana $>425,7$ nmol/L mogle biti potencijalni biljeg uspješnosti IVF postupka kod svih ispitanica, odnosno, pri vrijednosti P4 5. dana $>384,6$ nmol/L kod ispitanica s povišenim vrijednostima preovulacijskoga P4.

Ključne riječi: preovulacijski progesteron, postovulacijski progesteron, IVF

9. SUMMARY

The relationship between the preovulatory and postovulatory progesterone serum concentration and the outcome of in vitro fertilization

Aim: To investigate the influence of elevated preovulatory and postovulatory progesterone (P4) on the outcome of in vitro fertilization.

Materials and methods: This is a prospective cohort study which included 400 patients (300 in the control group and 100 in the group with elevated preovulatory P4 – 85 *normal responders* and 15 *high responders*). The IVF outcome among patients with normal preovulatory P4 as compared to the patients with elevated preovulatory P4, the IVF outcome among *normal* and *high responders*, the influence of the embryo transfer type (BET or FET) among patients with elevated preovulatory P4 on the outcome of IVF procedures and the influence of postovulatory P4 on the IVF outcome have been investigated in this study.

Results: Positive IVF outcome has been recorded in about one third of all the performed procedures in the control and the study group, with slightly better outcome with elevated preovulatory P4. Better outcome with FET among *normal responders* and a discretely better outcome with BET among *high responders* has been recorded. Better IVF outcome has been recorded with P4 on the 5th day $>425,7$ nmol/L among all the patients and with P4 on the 5th day $>384,6$ nmol/L among patients with elevated preovulatory P4.

Conclusion: Elevated preovulatory P4 has a slightly protective effect on IVF outcome while the P4 on the 5th day $>425,7$ nmol/L could be a potential marker for the success of the IVF procedures among all the patients and with P4 on the 5th day $>384,6$ nmol/L among patients with elevated preovulatory P4.

Keywords: preovulatory progesterone, postovulatory progesterone, IVF

PhD student: Emina Ejubović, MD, 2018

10. POPIS LITERATURE

1. Ciglar S. Bračna neplodnost. U: Šimunić V, ur. Ginekologija. Zagreb: Naklada Ljevak (Medicinska biblioteka); 2001. str. 349-57.
2. Jenkins J, Daya S, Kremer J, Balasch J, Barratt C, Cooke I, i sur. European Classification of Infertility Taskforce (ECIT) response to Habbema et al. Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a proposal. *Hum Reprod.* 2004;19(12):2687-8.
3. Maheshwari A, Hamilton M, Bhattacharya S. Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. *Hum Reprod.* 2008;23(3):538-42. doi: 10.1093/humrep/dem431.
4. Marchbanks PA, Peterson HB, Rubin GL, Wingo PA. Research on infertility: definition makes a difference. The Cancer and Steroid Hormone Study Group. *Am J Epidemiol.* 1989;130(2):259-67.
5. Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod.* 2005;20(5):1144-7.
6. Šimunić V, Jeren L. Plodnost žene i čimbenici koji je oštećuju. U: Šimunić V, ur. Kontracepcija i reprodukcijsko zdravlje, Zagreb: FotoSoft; 2002. str. 17-27.
7. Šimunić V. Plodnost i neplodnost čovjeka. U: Šimunić V, ur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost, Medicinski pomognuta oplodnja, IVF, Zagreb: Školska knjiga; 2012. str. 119-40.
8. Fritz MA, Speroff L, ur. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility.* 8. izd., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; 2011, str. 1137-90.
9. Ransom SB, ur. *Practical strategies in obstetrics and gynecology.* Philadelphia, WB Saunders; 2000. str. 609-28.
10. Tsevat DG, Wiesenfeld HC, Parks C, Peipert JF. Sexually transmitted diseases and infertility. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;216(1):1-9. doi: 10.1016/j.ajog.2016.08.008.
11. Tošić-Pajić J, Šeklić D, Radenković J, Marković S, Čukić J, Baskić D, i sur. Augmented oxidative stress in infertile women with persistent chlamydial infection. *Reprod Biol.* 2017;17(2):120-5. doi: 10.1016/j.repbio.2017.03.001.

12. Lessey BA, Kim JJ. Endometrial receptivity in the eutopic endometrium of women with endometriosis-it is affected: let me show you why. *Fertil Steril.* 2017;108(1):19-27. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.031.
13. Garcia-Velasco JA, Fassbender A, Ruiz-Alonso M, Blesa D, D'Hooghe T, Simon C. Is endometrial receptivity transcriptomics affected in women with endometriosis? A pilot study. *Reprod Biomed Online.* 2015;31(5):647-54. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.07.014.
14. Altmäe S, Tamm-Rosenstein K, Esteban FJ Simm J, Kolberg L, Peterson H, i sur. Endometrial transcriptome analysis indicates superiority of natural over artificial cycles in recurrent implantation failure patients undergoing frozen embryo transfer. *Reprod Biomed Online.* 2016;32(6):597-613. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.03.004.
15. Silverthorn DU. *Human Physiology: An Integrated Approach.* 6. izd., Glenview, IL: Pearson Education; 2013: str. 850–90.
16. Beshay VE, Carr BR. Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis and Control of the Menstrual Cycle. U: Falcone T, Hurd WW, ur. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide.* New York: Springer Science+Business Media; 2013. str. 31-42.
17. Lechan RM, Toni R. *Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary.* U: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, i sur., ur. *Endotext: Comprehensive FREE Online Endocrinology Book [Internet].* South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. [ažurirano 28.11.2016.; pristupljeno 16.07.2017.]. Dostupno na: www.endotext.org
18. Mancall EL, Brock DG, ur. *Gray's clinical neuroanatomy: the anatomic basis for clinical neuroscience.* Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. str. 259-93.
19. Hiller-Sturmhöfel S, Bartke A. The Endocrine System - An Overview. *Alcohol Health Res World.* 1998;22(3):153-64.
20. Grumbach M, Kaplan S. The neuroendocrinology of human puberty: an ontogenetic perspective. U: Grumbach M, Sizonenko P, Aubert M, ur. *Control of the onset of puberty.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1990. str. 189-203.
21. Yahalom D, Chen A, Ben-Aroya N, Rahimipour S, Kaganovsky E, Okon E, i sur. The gonadotropin-releasing hormone family of neuropeptides in the brain of

- human, bovine and rat: identification of a third isoform. *FEBS Lett.* 1999;463(3):289–94.
22. Yao B, Liu HY, Gu YC, Shi SS, Tao XQ, Li XJ, et al. Gonadotropin-releasing hormone positively regulates steroidogenesis via extracellular signal-regulated kinase in rat Leydig cells. *Asian J Androl.* 2011;13(3):438–45. doi: 10.1038/aja.2010.158.
23. Fister S, Gunthert AR, Aicher B, Paulini KW, Emons G, Grundker C. GnRH-II antagonists induce apoptosis in human endometrial, ovarian, and breast cancer cells via activation of stress-induced MAPKs p38 and JNK and proapoptotic protein Bax. *Cancer Res.* 2009;69(16):6473–81. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4657.
24. Haisenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, Marshall JC, Shupnik MA. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology.* 1991;128(1):509–17. doi: 10.1210/endo-128-1-509
25. Millar RP. GnRH II, and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14(1):35–43.
26. Siler-Khodr TM, Grayson M. Action of chicken II GnRH on the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(2):804–10. doi: 10.1210/jcem.86.2.7210
27. Messinis IE, Vanakara P, Zavos A, Verikouki C, Georgoulas P, Dafopoulos K. Failure of the GnRH antagonist ganirelix to block the positive feedback effect of exogenous estrogen in normal women. *Fertil Steril.* 2010;94(4):1554–6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.12.055.
28. An BS, Choi JH, Choi KC, Leung PC. Differential role of progesterone receptor isoforms in the transcriptional regulation of human gonadotropin-releasing hormone I (GnRH I) receptor, GnRH I, and GnRH II. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(2):1106–13. doi: 10.1210/jc.2004-0318
29. Kasum M, Franulić D, Čehić E, Orešković S, Lila A, Ejubović E. Kisspeptin as a promising oocyte maturation trigger for in vitro fertilisation in humans. *Gynecol Endocrinol.* 2017 Apr 10:1-5. doi: 10.1080/09513590.2017.1309019. [Epub ahead of print]

30. Cui J, Smith RG, Mount GR, Lo JL, Yu J, Walsh TF, i sur. Identification of Phe313 of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor as a site critical for the binding of nonpeptide GnRH antagonists. *Mol Endocrinol*. 2000;14(5):671–81. doi: 10.1210/mend.14.5.0464
31. Blockeel C, Sterrenburg MD, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, Smits J, Devroey P, i sur. Follicular phase endocrine characteristics during ovarian stimulation and GnRH antagonist cotreatment for IVF: RCT comparing recFSH initiated on cycle day 2 or 5. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(4):1122–8. doi: 10.1210/jc.2010-2239.
32. Struthers RS, Nicholls AJ, Grundy J, Chen T, Jimenez R, Yen SS, i sur. Suppression of gonadotropins and estradiol in premenopausal women by oral administration of the nonpeptide gonadotropin-releasing hormone antagonist elagolix. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(2):545–51. doi: 10.1210/jc.2008-1695.
33. Homburg R. The Mechanism of Ovulation. U: Arulkumaran S, Sciarra JJ, ur. *The Global Library of Women's Medicine. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO); 2014 - [ažurirano u veljači 2014.; pristupljeno 17.06.2017.]*. Dostupno na:
https://www.glowm.com/section_view/heading/The%20Mechanism%20of%20Ovulation/item/289
34. Blumenfeld Z. Response of human fetal pituitary cells to activin, inhibin, hypophysiotropic and neuroregulatory factors in vitro. *Early Pregnancy*. 2001;5(1):41–2.
35. Besecke LM, Guendner MJ, Sluss PA, Polak AG, Woodruff TK, Jameson JL, i sur. Pituitary follistatin regulates activin-mediated production of follicle-stimulating hormone during the rat estrous cycle. *Endocrinology*. 1997;138(7):2841–8. doi: 10.1210/endo.138.7.5279
36. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*. 1996;392(1):49–53.
37. Cahill DJ, Wardle PG, Harlow CR, Hull MG. Onset of the preovulatory luteinizing hormone surge: diurnal timing and critical follicular prerequisites. *Fertil Steril*. 1998;70(1):56–9.
38. Šimunić V. Menstuacijski ciklus. U: Šimunić V, ur. *Ginekologija*. Zagreb: Naklada Ljevak (Medicinska biblioteka); 2001. Str. 30-60.

39. Strauss J, Williams CJ, ur. Neuroendocrine control of the menstrual cycle. 6. izd. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009. Str. 358-95.
40. Military Obstetrics & Gynecology. Abnormal Bleeding. Hughey M, ur. [Internet] Chicago: Military Obstetrics & Gynecology; 2014 [pristupljeno 20.07.2017.].
Dostupno na:
https://www.brooksidepress.org/Products/Military_OBGYN/Textbook/AbnormalBleeding/Bleeding.htm
41. La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update*. 2014;20(1):124-40. doi: 10.1093/humupd/dmt037.
42. Verberg MF, Eijkemans MJ, Heijnen EM, Broekmans FJ, de Klerk C, Fauser BC, i sur. Why do couples drop-out from IVF treatment? A prospective cohort study. *Hum Reprod*. 2008;23(9):2050-5. doi: 10.1093/humrep/den219.
43. Broer SL, Dólleman M, Opmeer BC, Fauser BC, Mol BW, Broekmans FJ. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2011;17(1):46-54. doi: 10.1093/humupd/dmq034.
44. Nelson SM, Yates RW, Fleming R. Serum anti-Müllerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles--implications for individualization of therapy. *Hum Reprod*. 2007;22(9):2414-21. doi:10.1093/humrep/dem204
45. Orvieto R, Vanni VS, Gleicher N. The myths surrounding mild stimulation in vitro fertilization (IVF). *Reprod Biol Endocrinol*. 2017;15(1):48. doi: 10.1186/s12958-017-0266-1.
46. Zafeiriou S, Loutradis D, Michalas S. The role of gonadotropins in follicular development and their use in ovulation induction protocols for assisted reproduction. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 2000;5(2):157-67.
47. Loutradis D, Drakakis P, Vomvolaki E, Antsaklis A. Different ovarian stimulation protocols for women with diminished ovarian reserve. *J Assist Reprod Genet*. 2007; 24(12):597-611. doi: 10.1007/s10815-007-9181-2

48. Ben-Rafael Z, Benadiva CA, Ausmanas M, Barber B, Blasco L, Flickinger GL, i sur. Dose of human menopausal gonadotropin influences the outcome of an in vitro fertilization program. *Fertil Steril*. 1987;48(6):964–8.
49. Garcia-Velasco JA, Isaza V, Requena A, Martínez-Salazar FJ, Landazábal A, Remohí J, i sur. High doses of gonadotrophins combined with stop versus non-stop protocol of GnRH analogue administration in low responder IVF patients: a prospective, randomized, controlled trial. *Hum Reprod*. 2000;15(11):2292–6.
50. Siristatidis CS, Hamilton MP. What should be the maximum FSH dose in IVF/ICSI in poor responders? *J Obstet Gynaecol*. 2007;27(4):401-5. doi: 10.1080/01443610701327420
51. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinou S, Michalas S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1999;72(2):240–4.
52. Kowalik A, Barmat L, Damario M, Liu HC, Davis O, Rosenwaks Z. Ovarian estradiol production in vivo. Inhibitory effect of leuprolide acetate. *J Reprod Med*. 1998;43(5):413–7.
53. Dirnfeld M, Fruchter O, Yshai D, Lissak A, Ahdut A, Abramovici H. Cessation of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) upon down-regulation versus conventional long GnRH-a protocol in poor responders undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1999;72(3):406–11.
54. Surrey ES. Management of the poor responder: the role of GnRH agonists and antagonists. *J Assist Reprod Genet*. 2007;24(12):613–9. doi: 10.1007/s10815-007-9180-3
55. Al-Mizyen E, Sabatini L, Lower AM, Wilson CMY, Al-Shawaf T, Grudzinski JG. Does pretreatment with progestogen or oral contraceptive pills in low responders followed by the GnRHa flare protocol improve the outcome of IVF-ET? *J Assist Reprod Genet*. 2000;17(3):140–6.
56. Loutradis D, Stefanidis K, Drakakis P, Kallianidis K, El Sheikh A, Milingos S, i sur. Does pre-treatment with micronized progesterone affect the ovarian response to a gonadotropin releasing hormone agonist flare-up protocol? *Gynecol Endocrinol*. 2003;17(2):101–6.

57. Levy DP, Navarro JM, Schattman GL, Davis OK, Rosenwaks Z. The role of LH in ovarian stimulation. Exogenous LH: Let's design the future. *Hum Reprod.* 2002;15(11):2258–65.
58. Weissman A, Farhi J, Royburt M, Nahum H, Glezerman M, Levrán D. Prospective evaluation of two stimulation protocols for low responders who were undergoing in vitro fertilization embryo transfer. *Fertil Steril.* 2003;79(4):886–92.
59. Ng C, Trew G. Endocrinological Insights Into Different in vitro Fertilization Treatment Aspects. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2012; 7(4): 419-32. <https://doi.org/10.1586/eem.12.32>
60. 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 [Internet].* 2011 [pristupljeno 24.07.2017.]. Dostupno na: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD001750.pub3/abstract>
61. Humaidan P, Kol S, Papanikolaou EG, Engmann L, Benadiva C, Itskovitz-Eldor J, i sur. GnRH agonist for triggering of final oocyte maturation: time for a change of practice? *Hum Reprod Update.* 2011;17(4):510-24. doi: 10.1093/humupd/dmr008.
62. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine mediated event. *Physiol Rev.* 1999;79(2):263-323.
63. De Geyter C, De Geyter M, Huber PR, Nieschlag E, Holzgrewe W. Progesterone serum levels during the follicular phase of the menstrual cycle originate from the crosstalk between the ovaries and the adrenal cortex. *Hum Reprod.* 2002;17(4):933-9.
64. Keck C, Neulen J, Breig-Lauel S, Breckwoldt M. Elevated serum progesterone concentrations during the early follicular phase of the menstrual cycle: clinical significance and therapeutic implications. *Gynecol Endocrinol.* 1999;13(3):161-5.
65. Sims JA, Seltman HJ, Muasher SJ. Early follicular rise of serum progesterone concentrations in response to a flare-up effect of gonadotrophin-releasing hormone agonist impairs follicular recruitment for in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1994;9(2):235-40.

66. Tang Y, Gong F, Lin G, Lu G. Early follicular progesterone concentrations and in vitro fertilization pregnancy outcomes. *Fertil Steril.* 2007;87(4):991-4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.08.087
67. Huang JC, Jackson KV, Hornstein MD, Ginsburg ES. The effect of elevated serum progesterone during ovulation induction in in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.* 1996;13(8):617-24.
68. 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.* 2004;19(7):1525-9. DOI: 10.1093/humrep/deh272
69. Younis JS. „Premature luteinization“ in the era of GnRH analogue protocols: time to reconsider. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28(8): 689–92. doi: 10.1007/s10815-011-9585-x
70. Kasum M, Radakovic B, Simunic V, Oreškovic S. Preovulatory progesterone rise during ovarian stimulation for IVF. *Gynecol Endocrinol.* 2013;29(8):744-8. doi: 10.3109/09513590.2013.798280.
71. Kasum M, Simunić V, Vrčić H, Stanić P, Orešković S, Beketić-Orešković L. Follicular progesterone elevations with ovulation induction for IVF. *Gynecol Endocrinol.* 2014;30(8):537-41. doi: 10.3109/09513590.2014.916263.
72. 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;61(3):508-13.
73. Ubaldi F, Albano C, Peukert M, Riethmuller-Winzen H, Camus M, Smitz J, i sur. Subtle progesterone rise after the administration of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist cetrorelix in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Reprod.* 1996;11(7):1405-7.
74. Venetis CA, Kolibianakis EM, Papanikolaou E, Bontis J, Devroey P, Tarlatzis BC. Is progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotropin administration associated with the probability of pregnancy in in vitro fertilization? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2007;13(4):343-55. doi: 10.1093/humupd/dmm007

75. Kolibianakis EM, Venetis CA, Bontis J, Tarlatzis BS. Significantly lower pregnancy rates in the presence of progesterone elevation in patients treated with GnRH antagonists and gonadotrophins: a systematic review and meta-analysis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(3):464-70.
76. 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;19(5):433-57. doi: 10.1093/humupd/dmt014.
77. Martinez F, Coroleu B, Clua E, Tur R, Buxaderas R, Parera N, i sur. Serum progesterone concentrations on the day of HCG administration cannot predict pregnancy in assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online.* 2004;8(2):183-90.
78. Andersen CY, Bungum L, Andersen AN, Humaidan P. Preovulatory progesterone concentration associates significantly to follicle number and LH concentration but not to pregnancy rate. *Reprod Biomed Online.* 2011;23(2):187-95. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.04.003.
79. Griesinger G, Mannaerts B, Andersen CY, Witjes H, Kolibianakis EM, Gordon K. Progesterone elevation does not compromise pregnancy rates in high responders: a pooled analysis of in vitro fertilization patients treated with recombinant follicle-stimulating hormone/gonadotropin-releasing hormone antagonist in six trials. *Fertil Steril.* 2013;100(6):1622-8.e1-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.08.045.
80. Requena A, Cruz M, Bosch E, Meseguer M, Garcia-Velasco JA. High progesterone levels in women with high ovarian response do not affect clinical outcomes: a retrospective cohort study. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12:69. doi: 10.1186/1477-7827-12-69.
81. Fauser BC, Nargund G, Andersen AN, Norman R, Tarlatzis B, Boivin J, i sur. Mild ovarian stimulation for IVF: 10 years later. *Hum Reprod.* 2010;25(11):2678-84. doi: 10.1093/humrep/deq247.
82. Ejubović E, Kasum M, Stanić P, Juras J, Čehić E, Orešković S. Current preventive strategies for preovulatory progesterone elevation during ovarian stimulation for *in vitro* fertilization. *Acta Clin Croat.* 2016; 55(3):453-8. doi: 10.20471/acc.2016.55.03.14

83. Mahajan N. Should mild stimulation be the order of the day? *J Hum Reprod Sci.* 2013;6(4):220-6. doi: 10.4103/0974-1208.126282
84. Verberg MF, Macklon NS, Nargund G, Frydman R, Devroey P, Broekmans FJ, i sur. Mild ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update.* 2009;15(1):13-29. doi: 10.1093/humupd/dmn056.
85. Kyrrou D, Kolibianakis EM, Fatemi HM, Tarlatzis BC, Tournaye H, Devroey P. Is earlier administration of human chorionic gonadotropin (hCG) associated with the probability of pregnancy in cycles stimulated with recombinant folliclestimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists? A prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 2011;96(5):1112-5. doi: 0.1016/j.fertnstert.2011.08.029.
86. Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Pozzobon C, Tank P, Tournaye H, Bourgain C, i sur. Progesterone rise on the day of human chorionic gonadotropin administration impairs pregnancy outcome in day 3 singleembryo transfer, while has no effect on day 5 single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2009;91(3):949-52. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.12.064
87. Glujovsky D, Blake D, Bardach A, Farquhar C. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2016 [pristupljeno 03.08.2017.]. Dostupno na: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD002118.pub5/abstract>
88. Roque M, Valle M, Guimaraes F, Sampaio M, Geber S. Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer. *Fertil Steril.* 2015;103(5):1190-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.045.
89. Al-Azemi M, Kyrrou D, Kolibianakis EM, Humaidan P, Van Vaerenbergh I, Devroey P, i sur . Elevated progesterone during ovarian stimulation for IVF. *Reprod Biomed Online.* 2012;24(4):381-8. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.01.010.
90. Kasum M, Orešković S. Treatment of ovarian hyperstimulation syndrome: new insights. *Acta Clin Croat.* 2010;49:421-7.
91. Zarutskie PW, Kuzan FB, Dixon L, Soules MR. Endocrine changes in the late-follicular and postovulatory intervals as determinants of the in vitro fertilization pregnancy rate. *Fertil Steril.* 1987;47(1):137-43.

92. Bourgain C, Devroey P. The endometrium in stimulated cycles for IVF. *Hum Reprod Update*. 2003;9(6):515-22.
93. Gumaa SS, Almadfa ZA, Al-Aboudy NF. Luteal phase serum progesterone level: a potential predictive marker for pregnancy rate in intracytoplasmic sperm injection. *J Fac Med Baghdad*. 2013;55(2):179-81.
94. Mitwally MF, Diamond MP, Abuzeid M. Vaginal micronized progesterone versus intramuscular progesterone for luteal support in women undergoing in vitro fertilization–embryo transfer. *Fertil Steril*. 2010;93(2):554-69. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.02.047.
95. Brady PC, Kaser DJ, Ginsburg ES, Ashby RK, Missmer SA, Correia KF, et al. Serum progesterone concentration on day of embryo transfer in donor oocyte cycles. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(5):569-75. doi: 10.1007/s10815-014-0199-y.
96. Aslih N, Ellenbogen A, Shavit T, Michaeli M, Yakobi D, Shalom-Paz E. Can we alter pregnancy outcome by adjusting progesterone treatment at mid-luteal phase: a randomized controlled trial. *Gynecol Endocrinol*. 2017 Mar 9:1-5. doi: 10.1080/09513590.2017.1298742. [Epub ahead of print]
97. Lawrenz B, Garrido N, Samir S, Ruiz F, Melado L, Fatemi HM. Individual luteolysis pattern after GnRH-agonist trigger for final oocyte maturation. *PLoS One* [Internet]. 2017 May 1; [pristupljeno 27.08.2017.]; 12(5):e0176600. doi: 10.1371/journal.pone.0176600. eCollection 2017. Dostupno na: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0176600>
98. Lawrenz B, Ruiz F, Engelmann N, Fatemi HM. Individual luteolysis post GnRH-agonist-trigger in GnRH-antagonist protocols. *Gynecol Endocrinol*. 2017;33(4):261-4. doi: 10.1080/09513590.2016.1266325.
99. Morris R. ICSI [slika s interneta]. 2016 [pristupljeno 03.09.2017.] Dostupno na: <http://www.ivf1.com/lab-icsi/#>
100. Hosseinzadeh M. Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). 2015 [pristupljeno 03.09.2017.]. Dostupno na: <http://www.fertilityinstitutesandiego.com/our-services/fertility-treatment/in-vitro-fertilization-ivf/icsi/>
101. Racowsky C, Stern JE, Gibbons WE, Behr B, Pomeroy KO, Biggers JD. National collection of embryo morphology data into Society for Assisted Reproductive

- Technology Clinic Outcomes Reporting System: associations among day 3 cell number, fragmentation and blastomere asymmetry, and live birth rate. *Fertil Steril*. 2011;95(6):1985-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.02.009.
102. 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* [Internet] 2012 Dec [pristupljeno 04.10.2017.]; 9(12): e1001356. Dostupno na: <http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001356>
 103. Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. Zagreb (Hr): Wikimedia Foundation, Inc. 2010 – Neplodnost; [ažurirano 02.10.2017; pristupljeno 18.10.2017.]. Dostupno na: <https://hr.wikipedia.org/wiki/Neplodnost>
 104. Feldberg D, Goldman GA, Ashkenazi J, Dicker D, Shelef M, Goldman JA. The impact of high progesterone levels in the follicular phase of in vitro fertilization (IVF) cycles: a comparative study. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1989;6(1):11-4.
 105. 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*. 2011;26(7):1813-25. doi: 10.1093/humrep/der126.
 106. Cooke L, Nelson SM. Review Reproductive aging and fertility in an aging population. *The Obstetrician & Gynaecologist*. 2011;13:161–8. doi: 10.1576/toag.13.3.161.27668
 107. Rehman R, Jawaid S, Gul H, Khan R. Impact of peak estradiol levels on reproductive outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Pak J Med Sci*. 2014; 30(5): 986–91. doi: 10.12669/pjms.305.5175
 108. Papageorgiou T, Guibert J, Goffinet F, Patrat C, Fulla Y, Janssens Y, i sur. Percentile curves of serum estradiol levels during controlled ovarian stimulation in 905 cycles stimulated with recombinant FSH show that high estradiol is not detrimental to IVF outcome. *Hum Reprod*. 2002;17(11):2846–50.
 109. Kyrou D, Al-Azemi M, Papanikolaou EG, Donoso P, Tziomalos K, Devroey P, i sur. The relationship of premature progesterone rise with serum estradiol levels and number of follicles in GnRH antagonist/recombinant FSH-stimulated cycles. *Eur J*

- Obstet Gynecol Reprod Biol. 2012;162(2):165-8. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.02.025.
110. Younis JS, Haddad S, Matilsky M, Ben-Ami M. Premature luteinization: could it be an early manifestation of low ovarian reserve? *Fertil Steril.* 1998;69(3):461–5.
111. Arora R, Chan C, Ye XY, Greenblatt EM. Progesterone, progesterone/estradiol and ART outcomes in day-5 transfer cycles. *Gynecol Endocrinol.* 2017 Jul 2:1-5. doi: 10.1080/09513590.2017.1336217. [Epub ahead of print]
112. Lai TH, Lee FK, Lin TK, Horng SG, Chen SC, Chen YH, i sur. An increased serum progesterone-to-estradiol ratio on the day of human chorionic gonadotropin administration does not have a negative impact on clinical pregnancy rate in women with normal ovarian reserve treated with a long gonadotropin releasing hormone agonist protocol. *Fertil Steril.* 2009;92(2):508-14. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.06.036.
113. Aflatoonian A, Davar R, Hojjat F. Elevated serum progesterone/ MII oocyte ratio on the day of human chorionic gonadotropin administration can predict impaired endometrial receptivity. *Iran J Reprod Med.* 2014;12(6):427-34.
114. Singh N, Malik N, Malhotra N, Vanamail P, Gupta M. Impact of progesterone (on hCG day)/oocyte ratio on pregnancy outcome in long agonist non donor fresh IVF/ICSI cycles. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2016;55(4):503-6. doi: 10.1016/j.tjog.2015.09.005.
115. Hill MJ, Healy MW, Richter KS, Widra E, Levens ED, DeCherney AH, i sur. Revisiting the progesterone to oocyte ratio. *Fertil Steril.* 2017;107(3):671-676.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.11.019.
116. Li PF, Zhu H, Tan L, Zhao DM, Ma LY, Xiang YG, i sur. Effects of high progesterone on outcomes of in vitro fertilization-embryo transfer in patients with different ovarian responses. *Syst Biol Reprod Med.* 2015;61(3):161-7. doi: 10.3109/19396368.2015.1033779.
117. 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.* 2010;25(8):2092-100. doi: 10.1093/humrep/deq125.

118. Sonigo C, Dray G, Roche C, Cédric-Durnerin I, Hugues JN. Impact of high serum progesterone during the late follicular phase on IVF outcome. *Reprod Biomed Online*. 2014;29(2):177-86. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.03.027.
119. Huang B, Ren X, Wu L, Zhu L, Xu B, Li Y, i sur. Elevated Progesterone Levels on the Day of Oocyte Maturation May Affect Top Quality Embryo IVF Cycles. *PLoS One* [Internet]. 2016 Jan 8 [pristupljeno 15.10.2017.]; 11:e0145895. Dostupno na: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0145895>
120. Huang PC, Chen MJ, Guu HF, Yi YC, Ho JY, Chen YF, i sur. Effect of premature serum progesterone rise on embryo transfer outcomes and the role of blastocyst culture and transfer in assisted reproductive technology cycles with premature progesterone rise. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2015;54(6):641-6. doi: 10.1016/j.tjog.2014.03.014.
121. Corti L, Papaleo E, Pagliardini L, Rabellotti E, Molgora M, La Marca A, i sur. Fresh blastocyst transfer as a clinical approach to overcome the detrimental effect of progesterone elevation at hCG triggering: a strategy in the context of the Italian law. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;171(1):73-7. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.08.017.
122. Yang S, Pang T, Li R, Yang R, Zhen X, Chen X, i sur. The individualized choice of embryo transfer timing for patients with elevated serum progesterone level on the HCG day in IVF/ICSI cycles: a prospective randomized clinical study. *Gynecol Endocrinol*. 2015;31(5):355-8. doi: 10.3109/09513590.2014.995620.
123. Healy MW, Patounakis G, Connell MT, Devine K, DeCherney AH, Levy MJ, i sur. Does a frozen embryo transfer ameliorate the effect of elevated progesterone seen in fresh transfer cycles? *Fertil Steril*. 2016;105(1):93-9.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.015.
124. Wong KM, Mastenbroek S, Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril*. 2014;102(1):19-26. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.05.027.
125. Lawrenz B, Melado L, Fatemi HM. Premature progesterone rise in ART-cycles. *Reprod Biol*. 2018 Jan 6. pii: S1642-431X(17)30299-1. doi: 10.1016/j.repbio.2018.01.001. [Epub ahead of print]

126. Fanchin R, Righini C, de Ziegler D, Olivennes F, Ledée N, Frydman R. Effects of vaginal progesterone administration on uterine contractility at the time of embryo transfer. *Fertil Steril*. 2001;75(6):1136-40.
127. Gerotziafas GT, Van Dreden P, d'Argent EM, Lefkou E, Grusse M, Comtet M, i sur. Impact of blood hypercoagulability on in vitro fertilization outcomes: a prospective longitudinal observational study. *Thromb J*. 2017 Mar 28;15:9. doi: 10.1186/s12959-017-0131-7. eCollection 2017.
128. Pelzer ES, Allan JA, Waterhouse MA, Ross T, Beagley KW, Knox CL. Microorganisms within Human Follicular Fluid: Effects on IVF. *PLoS One* [Internet]. 2013 March 12 [pristupljeno 20.10.2017.]; 8(3):e59062. doi: 10.1371/journal.pone.0059062. Dostupno na: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059062>

11. KRATAK ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Doboju, BiH, 20. svibnja 1987. godine, a nastanjena u Zenici, gdje sam završila osnovnu školu kao učenik generacije, nižu glazbenu školu, odsjek glasovir te opću gimnaziju 2006. godine. Iste godine upisala sam Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu s najboljim uspjehom na prijamnome ispitu. Godine 2012. diplomirala sam kao najbolji student s prosječnom ocjenom 9,47, zbog čega sam nosilac titule Ponos Dekana, a 2013. godine zaposlila sam se kao liječnik sekundarac na Neurološkoj klinici Kliničkog centra Univerziteta u Sarajevu, potom na Odjelu ginekologije i porodiljstva Kantonalne bolnice Zenica.

Specijalizaciju iz Ginekologije i porodništva započela sam 2014. godine, a iste godine upisujem i Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij – Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Završila sam i dodatne izobrazbe iz ginekološke kirurgije i endoskopije, ultrazvuka te opstetričkih operacija.

Aktivno sam sudjelovala na simpozijima u BiH i Hrvatskoj te na 4 svjetska kongresa. Proglašena sam veleposlanicom Svjetskog kongresa „Kontroverzije u porodništvu, ginekologiji i infertilitetu (COGI)“ za BiH. Bila sam supredsjedateljica sesije slobodnih usmenih priopćenja na 24. i 25. Svjetskom COGI kongresu.

Kao autor i koautor objavila sam 9 znanstvenih publikacija i jedan sveučilišni udžbenik. Aktivno i pasivno govorim 6 stranih jezika: engleski, njemački, španjolski, talijanski, portugalski i turski.