

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Jelena D. Mici

PREDVIŠTAJANJE ISHODA ASISTIRANE
FERTILIZACIJE NA OSNOVU TESTOVA
OVARIJALNE REZERVE

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Jelena D. Micic

ASSISTED FERTILIZATION OUTCOME

ASSESSMENT USING OVARIAN

RESERVE TESTS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Mentor:

Prof. Dr Nebojša Radunovi , redovni profesor ginekologije i akušerstva, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

lanovi Komisije:

Prof. Dr Svetlana Vujovi , redovni profesor interne medicine – endokrinologije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. Dr Snežana Vidakovi , vanredni profesor ginekologije i akušerstva, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. Dr Sreten Bila, profesor ginekologije i akušerstva u penziji

Datum odbrane: 2016.

Mojoj porodici, hvala na ljubavi, strpljenju i podršci, što su uvek tu uz mene i za mene;

Mojim učiteljima, hvala na prenetom znanju i iskustvu i mudrim smernicama u poslovnim i životnim odlukama;

Mojim prijateljima, hvala na razumevanju i podršci u svim usponima i padovima;

Mojim saradnicima sa odeljenja ART Klinike za ginekologiju i akušerstvo KCS, hvala na stručnoj i prijateljskoj pomoći i tokom svih ovih godina;

Hvala svima onima koji se iskreno raduju svakom mom uspehu i doživljavaju ga kao deo svog uspeha...

PREDVIĐANJE ISHODA ASISTIRANE FERTILIZACIJE NA OSNOVU TESTOVA OVARIJALNE REZERVE

Rezime

Uvod: Optimizacija i individualizacija kontrolisane ovarijalne hiperstimulacije postaje sve značajnija, pa se brojna ispitivanja bave identifikacijom kliničkih parametara koji mogu da utiču na ovarijalni odgovor, kao i da povećaju efikasnost i bezbednost primenjene stimulacije. Cilj ovog istraživanja je ispitivanje mogućnosti predviđanja ovarijalnog odgovora i ishoda asistirane fertilizacije na osnovu biomarkera funkcionalne ovarijalne rezerve, kao i identifikacija onog koji bi imao preciznost nezavisnu od primenjenog protokola stimulacije.

Metodologija: Prospektivna kohortna studija je obuhvatila 363 pacijentkinje u postupku asistirane fertilizacije u okviru Nacionalnog programa na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije. Svima su određeni starost, indeks telesne mase, uzrok i vrsta infertiliteta. Broj antralnih folikula i vrednosti AMH, Inhibina B, FSH, LH, estradiola, progesterona i testosterona u serumu su mereni drugog dana ciklusa pre započinjanja stimulacije. Broj i kvalitet dobijenih oocita i embriona i stope biohemijskih i kliničkih trudnoća su korišćeni za evaluaciju prediktivne mogućnosti ovih biomarkera.

Rezultati: Pokazano je da su starost ispitanica, broj antralnih folikula, vrednost AMH i odnos FSH/LH prediktori broja dobijenih oocita kao i stope trudnoća. Dodatno, broj antralnih folikula je bio najvažniji parametar koji je uticao na broj dobijenih oocita i stopu trudnoća, nezavisno od primenjenog protokola stimulacije.

Zaključak: Individualizacija protokola stimulacija bi mogla biti poboljšana pristupom zasnovanim na broju antralnih folikula i vrednosti AMH, s obzirom da je pokazano da su veoma pouzdani prediktori kako adekvatnog tako i prekomernog ovarijalnog odgovora i značajni prediktori stope trudnoća, nezavisno od izabranog protokola stimulacije.

Cljučne riječi: kontrolisana ovarijalna hiperstimulacija, ovarijalna rezerva, biomarkeri, ovarijalni odgovor, ishod asistirane fertilizacije, broj antralnih folikula

Naučna oblast: Ginekologija i akušerstvo

Uža naučna oblast: Humana reprodukcija

ASSISTED FERTILIZATION OUTCOME ASSESMENT USING OVARIAN RESERVE TESTS

Abstract

Background The optimization and individualization of controlled ovarian stimulation have become increasingly important and significant efforts have been made to identify clinical parameters that can imply on the ovarian response and also improve efficacy and safety outcomes. The aim of this study was whether biomarkers of the functional ovarian reserve, as well as which one, are able to predict ovarian response and assisted fertilization outcome, with accuracy independent of selected treatment.

Methods A prospective cohort study included 363 patients who underwent assisted fertilization within National program at the Clinic of Gynecology and Obstetrics, Clinical Center of Serbia. Age, BMI, cause of infertility and the infertility type were determined for all patients. Antral follicle number, serum AMH, Inhibin B, FSH, LH, estradiol, progesterone and testosterone levels were measured on the 2nd cycle day prior to stimulation commencement. The number and quality of obtained oocytes and embryos and biochemical and clinical pregnancy rates were used in order to evaluate possible predictive function of these biomarkers.

Results Patients' age, number of antral follicles, AMH level and FSH/LH ratio were confirmed as predictors of the number of obtained oocytes and also pregnancy rates. Additionally, the number of antral follicles was the main parameter that influenced the number of obtained oocytes and pregnancy rates regardless of stimulation protocol.

ConclusionThe individualization of stimulation protocols may be further improved by using both AFC- and AMH- tailored approach since they are very reliable predictors of both adequate and excessive ovarian response, and significant predictors of pregnancy rates, regardless of selected stimulation protocol.

Key words: controlled ovarian stimulation, ovarian reserve, biomarkers, ovarian response, assisted fertilization outcome, antral follicle count

Scientific field: Gynecology and Obstetrics

Narrow scientific field: Human reproduction

SADRŽAJ

Uvod	1
Testovi ovarijalne rezerve	3
1. Hormonski testovi	4
1.1.folikulo-stimulišu i hormon (FSH)	4
1.2.luteiniziraju i hormon (LH) i FSH/LH odnos	5
1.3.estradiol (E2)	6
1.4.progesteron (P4) i P4/E2 odnos	7
1.5.testosteron	7
1.6.anti-Mullerian hormon	8
1.7.inhibin A i B	10
1.8.vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF)	10
1.9.odnos IGF-1/IGFBP-1	11
2. Dinami ki testovi	11
2.1.CCCT (clomiphene citrate challenge test)	11
2.2. GAST (GnRH-agonist stimulation test)	12
2.3. EFFORT (exogenous FSH ovarian reserve test)	12
3. Ultrasonografski markeri	13
3.1.broj antralnih folikula (AFC)	13
3.2.zapremina ovarijuma	14
3.3.ovarijalna folikularna vaskularizacija	14
4. Kombinacija biomarkera	15
Radna hipoteza	17
Ciljevi istraživanja	18

Metode istraživanja	19
Rezultati	23
Diskusija	44
Zaključak	54
Literatura	55
Biografija	72

UVOD

Od sredine prošlog veka, kada je ustanovljeno da između 30. i 40. godine života žene nastaje progresivni gubitak populacije folikula od oko 75%(1), sve više pažnje je usmereno na reproduktivni potencijal žene u fazi ovarijalnog starenja. Rastu i trend odlaganja rađanja za kasnije godine života žene u savremenom društvu i posledice smanjenja broja žena sa problemom infertiliteta koji je posledica smanjenja zalihe oocita, uz sve veću primenu metoda asistiranе reproduktivne tehnologije, doveli su do toga da pojam “ovarijalne rezerve” dobije poseban značaj, kako u kliničkoj praksi, tako i u naučnim istraživanjima.

U aktuelnoj kliničkoj literaturi, ovarijalna rezerva je nedvosmisleno definisana kao broj i funkcionalni kapacitet folikula preostalih u jajniku u datom trenutku (2) ili kao reproduktivni potencijal žene u funkciji broja i kvaliteta njenih preostalih oocita (3). Nasuprot tome, u istraživačkoj literaturi se smatra da u jajniku postoje dve funkcionalne rezerve: rezerva zaustavljenih, odnosno “ne – rastu ih” folikula i druga – “rastu ih” folikula. “Ne – rastu ih” su primordijalni folikuli, koji se sastoje od oocite zaustavljene u diploten stadijumu profaze I mejoze i jednog sloja pre-granuloza ćelija. Takvi folikuli su u stanju mirovanja tokom života dok se ne izgube atrezijom ili budu izabrani za dalju maturaciju. Rezerva “rastu ih” folikula podrazumeva one koji su aktivni u različitim stadijumima procesa folikulogeneze, odnosno primarne, sekundarne, preantralne, antralne i preovulatorne ili de Graafove folikule (4). Nekoliko drugih termina je predloženo, kao što su “dinamična rezerva” (5) ili “ovulatorni potencijal” (6), za taj deo rezerve folikula, koji odražava normalnu

folikulogenezu i može potencijalno biti indukovan za dalje sazrevanje i ovulaciju, zbog toga je od značaja u postupcima asistiranе fertilizacije.

Starenje ovarijuma je posledica procesa iscrpljivanja folikularne rezerve i pada kvaliteta oocita(7). Broj od oko 300000 folikula prisutnih u periodu menarhe je tokom života u konstatnom padu. Kada broj folikula padne ispod 25000, degenerativni procesi se ubrzavaju do otprilike 1000 preostalih folikula, što signalizira početak menopauze. Ovaj matematički model sugeriše da zapravo kritičan broj folikula, nasuprot kritičnim godinama, određuje pojavu menopauze (8). U razvijenim zemljama, prosečno se menopauza javlja u 51. godini, iako su epidemiološke studije pokazale da se u opštoj populaciji kod 10% žena menopauza dešava do 45. godine(9). Dokazano je da period smanjene fertiliteti prethodi pojavi menopauze i potpunog gubitka fertiliteti. Procenjeno je da 13 godina pre menopauze, čak i uz postojanje regularnih menstrualnih ciklusa, ovarijumi pokazuju ubrzani pad fertiliteti (10).

U nedostatku prihvatljivog zlatnog standarda, procena vrednosti testova ovarijalne rezerve je trenutno ograničena na njihovo vrednovanje u smislu sposobnosti da predvide ishod asistiranе fertilizacije kod žena sa problemom infertiliteti. Tokom poslednje tri decenije, dizajnirani su brojni testovi sa ciljem da se predvidi odgovor pacijentkinje na stimulaciju ovulacije, kao i šansa za postizanje trudnoće (11). Mnogi od tih testova su vremenom postali deo rutinskih dijagnostičkih procedura za žene sa problemom infertiliteti.

Ovarijalna rezerva se može smatrati normalnom kada stimulacija egzogenim gonadotropinima dovede do razvoja najmanje 8 – 10 folikula uz dobijanje odgovarajućeg broja kvalitetnih oocita posle punkcije folikula (12). Mogućnost pre-evaluacije ovarijalne rezerve i predikcije ovarijalnog odgovora na stimulaciju

ovulacije bi bila od velikog kliničkog značaja za određivanje odgovarajuće doze gonadotropina za svaku pacijentkinju pojedinačno (13). Korekcija doze na ovaj način, ne samo što bi smanjila verovatnoću kako lošeg, tako i ekcesivnog ovarijalnog odgovora, već bi omogućila optimalan odgovor ovarijuma na stimulaciju a posledično i poboljšala ishod asistiranе fertilizacije (14).

TESTOVI OVARIJALNE REZERVE

Postojanje širokog spektra testova ovarijalne rezerve sugerira da nijedan pojedinačni test ne daje dovoljno tačne rezultate. Pored kliničkih varijabli – starosti i istorije prethodno prekinutih ciklusa stimulacije ovulacije i histološke procene biopsijom ovarijuma, najčešće se koriste neki testovi ovarijalne rezerve, kako u kliničkoj praksi, tako i u istraživanjima, obuhvataju:

1. Hormonske testove – folikulo-stimulišući hormon (FSH), luteinizirajući hormon (LH), FSH/LH odnos, estradiol (E2), progesteron (P4), P4/E2 odnos, testosteron, anti-Müllerian hormon, inhibin A i B, vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), odnos IGF-1/IGFBP-1 (odnos insulinu sličnog faktora rasta i njegovog vezujućeg proteina);
2. Dinamičke testove – CCCT (clomiphene citrate challenge test), test stimulacije GnRH agonistima – GAST (GnRH-agonist stimulation test), test egzogenim FSH–EFFORT (exogenous FSH ovarian reserve test);
3. Ultrasonografske testove – broj antralnih folikula (AFC), zapremina ovarijuma, ovarijalna folikularna vaskularizacija;

1. HORMONSKI TESTOVI

1.1. FOLIKULOSTIMULIŠU I HORMON (FSH)

Bazalna vrednost folikulostimulišeg hormona (FSH) je najčešće korišćen test za određivanje ovarijalne rezerve, što potvrđuje i najveći broj objavljenih studija iz ove oblasti (2). Ograničenja merenja FSH uključuju nedostatak tačno definisane granice vrednosti, mesečne varijacije i neslaganja različitih laboratorijskih eseja. Studija koja se bavila procenom značaja bazalne vrednosti FSH u predikciji ishoda in vitro fertilizacije kod žena starijih od 40 godina, odredila je vrednost od 11.1 mIU/mL kao granicu, iznad koje ne dolazi do trudnoće (15). Rezultati druge studije su pokazali da su žene sa bazalnim vrednostima FSH preko 15 mIU/mL, imale manje oocita posle punkcije folikula i aspiracije, kao i veći broj prekinutih ciklusa stimualcije ovulacije, u odnosu na žene koje su imale niže bazalne vrednosti, bez značajne razlike u primljenim dozama gonadotropina (16).

Iako je bazalna vrednost FSH najčešće korišćen test ovarijalne rezerve, od značaja je u predikciji lošeg odgovora samo kada se primeni na veoma visoke granice vrednosti. U kliničkoj praksi, takve vrednosti se javljaju samo malom udelu, s obzirom da vrednost FSH ostaje unutar granica referentnih vrednosti i počinje značajno da raste tek kada je funkcija ovarijuma uveliko kompromitovana, tako da se sama vrednost FSH ne može koristiti kao kriterijum za isključivanje iz postupka asistiranе reprodukcije (2). Dodatno, sugerisano je čak i da se bazalna vrednost FSH isključi iz inicijalnog ispitivanja žena sa infertilitetom i klinički normalnim ciklusima, s obzirom da je do trudnoće dolazilo kod skoro 50% žena sa povišenim bazalnim vrednostima (17).

Nekoliko kasnije objavljenih studija nije uspelo da potvrdi značaj FSH kao markera ovarijalne rezerve, ali su otvorile neke nove perspektive. Jedna od studija je pokazala

da se različite molekularne izoforme FSH sekretuju kao rezultat varijacije procesa glikozilacije pod uticajem hormonskih varijacija zavisno od ciklusa i godina starosti. Posle hromatografskog odvajanja FSH izoformi, na ena je značajna razlika u pH vrednosti od 5.1 do 5.0 između u onih koji su imali dobar i loš odgovor na prethodnu stimulaciju gonadotropinima. Na osnovu toga, razvili su hipotezu da koncentracije nekih FSH izoformi različito deluju na folikularnu dinamiku i smanjuju kvalitet oocita (18).

Ispitivanje prediktivne vrednosti bazalnog FSH na pojavu spontane trudnoće kod subfertilnih žena, mlađih od 40 godina, sa ovulatornim ciklusima, ukazalo je na manje šanse kada su vrednosti FSH bile veće od 8 IU/L, dok za niže vrednosti nije na ena korelacija (19). Kontroverzni rezultati su se nastavili studijom u kojoj su dobijene veće stope trudnoća kod žena mlađih od 35 godina sa visokim vrednostima FSH u odnosu na starije žene sa normalnim vrednostima gonadotropina, pa su autori savetovali pažljiviji pristup pacijentima od 35. do 40. godine, zbog većeg broja prekinutih ciklusa i lošijeg ovarijalnog odgovora na stimulaciju, kao i da visoke vrednosti FSH ne treba da budu prepreka za postupke asistiranu reprodukciju (20).

Iako bazalne vrednosti FSH ostaju najčešće korišćeni marker ovarijalne rezerve u IVF centrima širom sveta, u istraživanjima je nastavljeno traganje za reprezentativnijim rezultatima sve više se ističu drugi markeri.

1.2. LUTEINIZIRAJUĆI HORMON (LH) I FSH/LH ODNOS

Srednja vrednost LH, LH amplituda i odgovor LH na GnRH su viši kod žena sa pretećom ovarijalnom insuficijencijom koja se manifestuje porastom vrednosti FSH i iregularnim ciklusima (21).

Odnos FSH/LH tako e može biti od zna aja u predikciji ovarijalnog odgovora na stimulaciju gonadotropinima. Pove an bazalni FSH/LH odnos, ak iako je vrednost FSH u granicama normale, smatra se znakom smanjene ovarijalne rezerve (22). Odnos FSH/LH raste pre vrednosti samog FSH, i ako se na e uz normalne vrednosti FSH u ranoj folikularnoj fazi, ukazuje na sledstveni loš odgovor na kontrolisanu ovarijalnu hiperstimulaciju (23).

1.3. ESTRADIOL (E2)

Prva studija koja je povezala vrednost FSH i E2 sa ishodom asistirane reprodukcije sugerisala je da merenje bazalne vrednosti estradiola uz FSH može dati preciznije predvi anje reproduktivnog potencijala od same vrednosti FSH u kombinaciji sa godinama starosti (24). Tako e, dokazano je i da su bazalne vrednosti E2 obrnuto proporcionalne ovarijalnom odgovoru na stimulaciju gonadotropinima. Žene sa povišenim vrednostima estradiola u ranoj folikularnoj fazi imale su lošiju prognozu, sa ve om stopom prekinutih ciklusa stimulacije ovulacije pre IVF i manjom stopom trudno a posle IVF, nezavisno od vrednosti FSH (25). U odsustvu supresije GnRH agonistima pre tretmana, zapaženo je da i ako su vrednosti FSH manje od 20 mIU/mL, do trudno e nije dolazilo ako su vrednosti estradiola bile ve e od 75 pg/mL (26). Nasuprot tome, ve ina studijanije pokazala jasnu vezu vrednosti bazalnog estradiola i ishoda tretmana. Analiza 10 odvojenih studija u kojima je merena vrednost E2 pre zapo injanja stimulacije, pokazala je malu prediktivnu vrednost estradiola i za ovarijalni odgovor na stimulaciju i za krajnji ishod – trudno u (2).

1.4. PROGESTERON (P4) i P4/E2 ODNOS

Skra ena folikularna faza, prerani skok LH i prevremeni porast vrednosti progesterona koji se nalaze kod žena sa smanjenom ovarijalnom rezervom, naveli su na zaključak da bi merenje vrednosti progesterona moglo biti od značaja u identifikaciji žena kod kojih je ovarijalna rezerva kompromitovana. Međutim, dnevno merenje estradiola i progesterona na ženama-dobrovoljcima sa ovulatornim ciklusima, nije pokazalo značajne promene vrednosti progesterona u funkciji godina (27). Kada je merenje vrednosti progesterona 10.dana ciklusa uključeno u CCCT ispitivanje, više vrednosti P4 su nađene kod žena sa smanjenom ovarijalnom rezervom, skraćenom folikularnom fazom i lošim ishodom reprodukcije (28). Prevremena lutinizacija, definisana kao odnos P4/E2 veći od 1 u kasnoj folikularnoj fazi ciklusa, značajno utiče na klinički reproduktivni ishod, može biti u vezi sa smanjenom ovarijalnom rezervom i nije obavezno LH-zavisna (29). ROC analiza P4/E2 odnosa u vreme embriotransfera kod IVF pacijenata, pokazala je da se ovaj odnos razlikuje između žena kod kojih je došlo do trudnoće i onih kod kojih nije došlo do trudnoće u tom ciklusu (30). Iz svega navedenog se može zaključiti da vrednost serumskog progesterona može biti od značaja u proceni IVF pacijenata između ciklusa stimulacije, ali nema značaja u prospektivnom ispitivanju ovarijalne rezerve.

1.5. TESTOSTERON

Prenatalna ekspozicija višku testosterona dovodi do smanjenja broja primordijalnih folikula i preranog folikularnog regrutovanja, što implicira značaj testosterona u prevremenoj ovarijalnoj insuficijenciji (31). Proizvodnja testosterona u ovarijumu se

smanjuje sa godinama, ali bez naglog pada u menopauzi (32). Do sada studije nisu pokazale njegov značaj u predikciji ovarijalnog odgovora kod IVF pacijenata.

1.6. ANTI-MULLERIAN HORMON (AMH)

Anti-Mullerian hormon je glikoprotein iz TGF- β superfamilije koji sprečava razvoj Milerovih kanala muških embriona. Kod ženske dece, nije prisutan sve do puberteta, kada granulosa ćelije preantralnih i malih antralnih folikula počinju da ga proizvode sa ciljem inhibiranja prekomerne FSH-indukovane regrutacije folikula (33).

AMH je otkriven kao biomarker ovarijalne rezerve relativno skoro, ali ima više prednosti u odnosu na druge metode ispitivanja. Smatra se da je AMH marker koji se prvi menja sa godinama starosti, pa tako može ukazati na smanjenu ovarijalnu rezervu pre drugih uobičajenih testova. Jedna od studija je pokazala značajan pad vrednosti AMH pre menopauze kod žena sa prethodno regularnim menstrualnim ciklusima, pri čemu je otkrivena i značajna korelacija između nivoa AMH u serumu i broja antralnih folikula (34). Za razliku od FSH, AMH se ne mora meriti određenog dana ciklusa (35). Dodatno, serijski merene vrednosti AMH tokom nekoliko meseci pokazuju manje interciklične varijacije u odnosu na FSH, inhibin B i estradiol (36). U ciklusima asistirane reprodukcije, žene sa lošim odgovorom (kod kojih je prekinuta stimulacija ili kod kojih je dobijeno manje od 4 oocite aspiracijom) su imale niže vrednosti AMH i manji broj antralnih folikula pred početak stimulacije ovulacije u odnosu na žene sa dobrim odgovorom na egzogene gonadotropine (37). Takođe, uočena je i snažna korelacija između ova dva markera, koji su se pokazali kao značajni prediktori ovarijalnog odgovora na stimulaciju.

Studija koja je prospektivno ispitivala žene starije od 38 godina, sa bazalnim vrednostima FSH većim od 10 mIU/mL, koje su prethodno imale loš odgovor na

stimulaciju ovulacije (manje od 4 folikula ve a od 15 mm), pore enjem onih kod kojih je završen ciklus asistirane reprodukcije do kraja sa onima kod kojih je prekinut, otkrila je zna ajno povišene vrednosti FSH i zna ajno snižene vrednosti AMH i inhibina B u grupi kod koje je prekinuta stimulacija zbog neadekvatnog ovarijalnog odgovora. Tako e, prema njihovim nalazima, AMH je bio najbolji pojedina ni marker ovarijalnog odgovora na egzogenu stimulaciju (38).

Uprkos ovim nalazima, sistematska analiza studija je našla samo dve dobro dizajnirane studije koje su ispitivale AMH i predikciju ovarijalnog odgovora, pa se zbog toga AMH nije mogao smatrati superiornijim u odnosu na ostale biomarkere (2).

Od tada, brojne studije su sprovedene sa ciljem da se dokaže zna aj ovog hormona.

Dokazano je da su vrednosti AMH u serumu bile zna ajno više kod žena sa dobrim odgovorom na stimulaciju u odnosu na one sa lošim, što je potvrdilo prethodne nalaze. U predikciji broja oocita dobijenih aspiracijom, bazalna vrednost AMH je imala najve u površinu pod krivom, a zatim su sledili broj antralnih folikula i godine starosti (39).

Neke studije su pokušale da dovedu u vezu vrednost AMH i pojavu trudno e u ciklusima asistirane reprodukcije. Na eno je da su vrednosti ve e od 2.7 ng/mL vezane za ve u stopu implantacije i trudno e (iako ne zna ajno), kao i da je vrednost AMH izmerena na dan davanja hCG bila zna ajnija u predikciji kvaliteta embriona u odnosu na bazalnu vrednost FSH (40).

Uprkos brojnim nalazima studija, pravi zna aj AMH u predikciji kako ovarijalne rezerve, tako i ovarijalnog odgovora, još uvek nije precizno definisan.

1.7. INHIBIN A I B

Inhibini su glikoproteini iz TGF- β superfamilije, strukturno slični AMH. Sekretuju granulosa i teka ćelije i imaju ulogu selektivne inhibicije sekrecije FSH u hipofizi (41). Inhibin B se proizvodi i ima ulogu na početku u prvoj polovini folikularne faze, dok je inhibin A dominantni inhibin u kasnoj folikularnoj i lutealnoj fazi ciklusa (42). Shodno tome, inhibin B je bio pogodniji za primenu u reproduktivnoj endokrinologiji. Primena inhibina B u ispitivanjima je pokazala da su koncentracije ovog hormona značajno snižene kod žena starijih od 35 godina (43). Kasnije studije su ove nalaze proširile, pokazuju i da ukoliko je vrednost inhibina B trećeg dana ciklusa bila manja od 45 pg/mL, ovarijalni odgovor na gonadotropine je bio lošiji, stopa prekinutih IVF ciklusa je bila veća, broj oocita dobijenih aspiracijom je bio manji i stopa trudnoća je bila značajno snižena u odnosu na žene kod kojih su vrednosti inhibina B bile veće od 45 pg/mL (44).

Druge studije nisu potvrdile značaj inhibina B kao markera ovarijalne rezerve (45), a nijedna studija do sada nije potvrdila pretpostavku od pre 20 godina o mogućoj vezi koncentracije inhibina B i kvaliteta oocita u ciklusima asistirane reprodukcije (46).

Analizom 9 velikih studija koje su uključivale podatke o prediktivnim mogućnostima inhibina B, nađeno je da vrednosti ovog hormona imaju visoku stopu lažno-pozitivnih nalaza, što dovodi do nepotrebnog isključivanja žena sa nižim vrednostima inhibina B iz IVF postupka (2).

1.8. VASKULARNI ENDOTELNI FAKTOR RASTA (VEGF)

Vrednost VEGF je obrnuto proporcionalna vrednostima progesterona i inhibina A. Normalni VEGF posredovani parakrini odgovor na nivo P4 i inhibina A je znak oduvanje ovarijalne rezerve (47). Neke studije su pokazale da su snižene vrednosti

VEGF u serumu i u folikularnoj te nosti vezane za bolji ovarijalni odgovor i višu stopu trudnoća(48).

1.9. IGF-1/IGFBP-1 ODNOS (odnos insulina sli nog faktora rasta i njegovog vezujućeg proteina)

Žene sa smanjenom ovarijalnom rezervom imaju značajno niži IGF-1/IGFBP-1 odnos u folikularnoj te nosti u odnosu na žene sa obilnom ovarijalnom rezervom(49). Vrednosti IGF-1 i njegovog vezujućeg proteina se menjaju kao funkcija ovarijalne rezerve i mogu odražavati ili razlike u kvalitetu oocita ili suboptimalno okruženje u folikularnoj te nosti(50).

2. DINAMI KI TESTOVI

2.1. CCCT (clomiphene citrate challenge test)

Klomifen citratom – provocirani test je jedan od prvih na ina ispitivanja ovarijalne rezerve. Prema originalnoj studiji, vrednosti FSH, LH i estradiola su merene 2/3 dana ciklusa (bazalne vrednosti) i 10/11 dana ciklusa (vrednosti ovarijalnog odgovora) pre i posle oralog uzimanja 100 mg klomifen citrata od 5. do 9. dana ciklusa (51). S obzirom da su sve ispitivane žene imale bazalne vrednosti FSH u granicama normale, pokazano je da žene, kod kojih su vrednosti FSH posle primene klomifen citrata bile izrazito povišene, imaju smanjenu ovarijalnu rezervu. U prospektivnoj studiji koja je obuhvatila preko 200 slučajno izabranih pacijentkinja sa infertilitetom, dobijen je loš nalaz CCCT-a u oko 10% ispitivanih i primećeno je da porast incidence lošeg nalaza testa vezan za starost počinje u ranim tridesetim godinama (52). Ovom testu je pripisivana odlična prediktivna vrednost za postizanje trudnoće u prirodnim ciklusima, tokom indukcije ovulacije i u ciklusima asistirane fertilizacije (53).

Nasuprot tome, na eno je da bazalna vrednost FSH i CCCT imaju sli ne mogu nosti predikcije klini kih trudno a(45); pri emu je normalan nalaz oba testa bio u potpunosti beskoristan u predikciji, dok je nenormalan nalaz ovih testova prakti no potvr ivao da do trudno e ne e do i posle postupka (54). Komparativne studije su potvrdile da zna aj CCCT-a u predikciji ovaraijalnog odgovora nije ve i od FSH i broja antralnih folikula, najviše zbog niske specifi nosti (2). Shodno tome, CCCT se retko rutinski upotrebljava u ispitivanju ovarijalne rezerve (13).

2.2. GAST (GnRH-agonist stimulation test) - test stimulacije GnRH agonistima

Fiziološki odgovor na terapiju GnRH agonistima obuhvata nagli porast vrednosti estradiola pra en dubokom supresijom ove vrednosti (55). Posledi no, pretpostavljeno je da latentno pogoršanje ovarijalne rezerve može biti otkriveno nalaženjem razlika u vrednostima endogenih gonadotropina i estradiola posle davanja GnRH agonista (56). Za razliku od CCCT, ovim pristupom se može ispitati i ovarijalni odgovor i proizvodnja gonadotropina u hipofizi. Kada se koristi kod žena sa regularnim ciklusima, GAST pokazuje veliku preciznost u predikciji lošeg odgovora i kandidat je za obimnija istraživanja koja bi to potvrdila (2).

2.3. EFORT (exogenous FSH ovarian reserve test) - test egzogenim FSH

Originalno opisan, ovaj test ovarijalne rezerve je podrazumevao merenje bazalne vrednosti FSH i estradiola, pra eno intramuskularnim davanjem standardne doze od 300 IU pre iš enog FSH. Posle 24 asa ponavljano je merenje vrednosti estradiola (57). Dva menstrualna ciklusa kasnije, ra en je IVF postupak sa primenom GnRH agonista i humanog menopauzalnog gonadotropina. Pove anje vrednosti estradiola i

bazalne vrednosti FSH su procenjivani i poređeni sa sledejućim kvalitetom ovarijalnog odgovora i ishodom trudnoće u IVF postupku. Analizom tri objavljene studije u kojima je primenjen EFORT, dobijena je značajna stopa lažno pozitivnih nalaza (2). Dodatno, retko se upotrebljava i zbog dugog vremenskog perioda koji je potreban za njegovu primenu.

3. ULTRASONOGRAFSKI MARKERI

3.1. BROJ ANTRALNIH FOLIKULA (AFC)

Gubitak ovarijalne rezerve tokom vremena je funkcionalno vezan za smanjenjem broja antralnih folikula dostupnih za regrutaciju pod uticajem gonadotropina, pa se transvaginalni ultrasonografski pregled ovarijuma koristi za procenu stanja i aktivnosti ovarijuma pre i tokom tretmana plodnosti. Pokazano je da je na osnovu broja antralnih folikula pre nika 2 do 5 mm izmeren 1/2 dana ciklusa ili neposredno pred terapiju gonadotropinima moguće predvideti ovarijalni odgovor i šansu za trudnoću, i da do trudnoće ne dolazi ukoliko je broj antralnih folikula manji od 5 (58,59).

Nedostatak broja antralnih folikula kao biomarkera uključuje razlike između pregleda dva ultrasonografičara, kao i biološke varijacije (60), ali s obzirom da broj antralnih folikula može značajno bolje predvideti loš ovarijalni odgovor od vrednosti FSH, ovaj biomarker se smatra testom prvog izbora po nekim studijama (61,62). Meta analiza 15 objavljenih studija u kojima je ispitivan značaj broja antralnih folikula, pokazala je da ovaj test ima značaj u predikciji lošeg odgovora kod žena sa regularnim ciklusom samo onda kada se postavi veoma niskadonja granica, a da zbog ograničenog broja loših rezultata testa, broj antralnih folikula ne može imati klinički značaj u predikciji trudnoće (2).

3.2. ZAPREMINA OVARIJUMA

Zapremina ovarijuma se obično smanjuje sa starenjem žene. Pokazano je da postoji obrnuta proporcija između zapremine ovarijuma, broja folikula i vaskularizacije strome i godina žene (63). Ovaj nalaz je potvrdio prethodnu evaluaciju preko 200 IVF ciklusa, gdje je utvrđeno da je zapremina ovarijuma klinički značajan prediktor uspeha reprodukcije i superiorniji u odnosu na koncentracije FSH i estradiola u proceni ovarijalne rezerve (64). Međutim, koliko god da se niska donja granica zapremine ovarijuma koristi, kada je koristi sam, ovaj test nema jasnu vrednost u predikciji neuspeha u postizanju trudnoće u IVF pacijentima, pa je meta-analizom pokazano da zapremina ovarijuma nije pogodna kao rutinski test u proceni ovarijalne rezerve (2).

3.3. OVARIJALNA VASKULARIZACIJA

Od početka primene transvaginalnog ultrazvuka za monitoring indukcije ovulacije u IVF ciklusima, dosta istraživača se bavilo primenom ultrazvuka u proceni ovarijalne rezerve. Od tada, transvaginalni Doppler je primenjivan u ispitivanju ovarijalnog protoka krvi kako u spontanim, tako i u stimulisanim ciklusima (65). Kasnije studije su otkrile značajnu negativnu korelaciju između godina i ovarijalnog perifolikularnog protoka krvi na dan davanja hCG ili dan pre toga, ali ne ranije (66), a visok stepen ovarijalnog perifolikularnog protoka krvi u ranoj folikularnoj fazi IVF ciklusa je povezan sa većom stopom kliničkih trudnoća (67). Kada je ispitivanje ovarijalne vaskularizacije primenjeno u vreme aspiracije oocita, nađena je statistički značajna veća stopa trudnoća kada je u grupi embriona vraćenih embriotransferom bio bar jedan embrion nastao od oocite iz dobro vaskularizovanog folikula (68). Druga studija je otkrila vezu između niskog arterijskog indeksa pulsatilnosti u ovarijalnoj stromi i

ve e stope trudno a, kao manjih koli ina gonadotropina potrebnih za stimualciju ovulacije (69). Me utim, meta-analiza prediktivnog kapaciteta ovarijalne vaskularizacije nije mogla biti završena zbog heterogenosti studija, što je posledica razlika u opremi i razli itim tehnikama merenja (2).

4. KOMBINACIJA BIOMARKERA

S obzirom da dosadašnje studije nisu uspele da odrede test ovarijalne rezerve koji bi imao zadovoljavaju u senzitivnost i specifi nost, tražena je kombinacija biomarkera koja bi adekvatnije procenila ovarijalni kapacitet. Me utim, meta-analiza 11 studija koje su predlagale razli ite modele evaluacije ovarijalne rezerve je pokazala da su sve kombinacije imale sli nu mogu nost predvi anja lošeg odgovora na stimulaciju ovulacije kao i sam broj antralnih folikula (70). Ove multivarijatne modele su sa injavale studije od kojih je malo uklju ivalo AMH, a nijedna kombinaciju AMH i broja antralnih folikula, koji su poslednjih godina najaktuelniji u ispitivanju ovarijalne rezerve. Dakle, potrebno je još studija koje bi evaluirale ovu i druge kombinacije testova da bi se našao adekvatan model koji bi omogu io najbolji pristup u tretmanu subferilnih parova (71).

Pretraživanje biohemijskih i ultrasonografskih markera koji bi mogli da previde odgovor u ciklusima asistirane fertilizacije smanjilo bi cenu i potencijalne neželjene efekte prekomernog davanja egzogenih gonadotropina. Kod mladih žena, takvi markeri bi omogu ili individualni pristup, predikcijom potrebnih doza lekova za stimulaciju, kao i rezultata, na osnovu pretpostavljene dostupne kohorte folikula. Kod starijih, bilo bi mogu e odrediti šanse za uspeh u le enju infertiliteta.

Postoji opšta saglasnost da bi najbolji marker ovarijalne rezerve trebalo da može da identifikuje žene i je bi šanse za trudno u u ciklusima asistiranje reprodukcije bile toliko blizu nule, da ne bi bilo ispravno izlagati ih potencijalnim neželjenim efektima egzogene stimulacije. Na žalost, trenutno dostupni testovi ne daju dovoljno pouzdane rezultate da bi se smatrali idealnim.

Markeri ovarijalne rezerve bez sumnje zauzimaju važno mesto u inicijalnom pristupu u le enju subfertilnog para, predvi anjem mogu nosti nezadovoljavaju ih rezultata što se može popraviti razli itim protokolima stimulacije, smanjenjem dodatnog psihološkog i finansijskog optere enja i pojave neželjenih efekata. Mogu nosti testova da predvide ovarijalni odgovor obi no prevazilaze njihovu mogu nost predikcije trudno e, zato što to dalje zavisi i od mnogih drugih faktora kao što su karakteristike gameta, kvalitet semena, upotrebljene tehnike fertilizacije, razvoja embriona, karakteristike šupljine materice i endometrijalno – peritonealne mikrosredine.

Imaju i u vidu sve ovo, jasno je da je potrebno još istraživanja koja bi razjasnila prediktivnu vrednost markera ovarijalne rezerve i odgovora, i eventualno našla multivarijantni model kombinovanja više od jednog markera, uključuju i AMH i broj antralnih folikula, koji su se prema ve ini dosadašnjih istraživanja pokazali kao najefikasniji.

RADNA HIPOTEZA

1. Na osnovu bazalne vrednosti hormona: FSH, LH, estradiola, progesterona, testosterona, inhibina B i AMH 2./3. dana menstrualnog ciklusa, može se predvideti ishod in vitro fertilizacije (broj i kvalitet dobijenih jajnih elija, broj i kvalitet embriona, nastanak biohemijske i kliničke trudnoće, razvoj sindroma ovarijalne hiperstimulacije).
2. Na osnovu odnosa FSH/LH 2./3. dana menstrualnog ciklusa može se predvideti ishod in vitro fertilizacije (broj i kvalitet dobijenih jajnih elija, broj i kvalitet embriona, nastanak biohemijske i kliničke trudnoće, razvoj sindroma ovarijalne hiperstimulacije).
3. Na osnovu broja antralnih folikula 2./3. dana menstrualnog ciklusa može se predvideti ishod in vitro fertilizacije (broj i kvalitet dobijenih jajnih elija, broj i kvalitet embriona, nastanak biohemijske i kliničke trudnoće, razvoj sindroma ovarijalne hiperstimulacije).
4. Na osnovu kombinacije ovih testova može se predvideti ishod in vitro fertilizacije (broj i kvalitet dobijenih jajnih elija, broj i kvalitet embriona, nastanak biohemijske i kliničke trudnoće, razvoj sindroma ovarijalne hiperstimulacije).

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Mogu nost predikcije a) broja dobijenih jajnih elija, b) broja i kvaliteta embriona, c) nastanka biohemijske i klini ke trudno e, d) razvoja sindroma ovarijalne hiperstimulacije, na osnovu hormonskog statusa 2./3. dana ciklusa (FSH, LH, estradiol, progesteron, testosteron, AMH, inhibin B)
2. Mogu nost predikcije a) broja dobijenih jajnih elija, b) broja i kvaliteta embriona, c) nastanka biohemijske i klini ke trudno e, d) razvoja sindroma ovarijalne hiperstimulacije, na osnovu odnosa FSH/LH 2./3. dana ciklusa
3. Mogu nost predikcije a) broja dobijenih jajnih elija, b) broja i kvaliteta embriona, c) nastanka biohemijske i klini ke trudno e, d) razvoja sindroma ovarijalne hiperstimulacije, na osnovu broja antralnih folikula izmerenih ultrazvu nim pregledom 2./3. dana ciklusa
4. Mogu nost predikcije a) broja dobijenih jajnih elija, b) broja i kvaliteta embriona, c) nastanka biohemijske i klini ke trudno e, d) razvoja sindroma ovarijalne hiperstimulacije, na osnovu kombinacije ovih testova ovarijalne rezerve

METODE ISTRAŽIVANJA

Prospektivnom kohortnom studijom je obuhvaćeno 363 pacijentkinje kojima je urađen postupak asistirane fertilizacije u okviru Nacionalnog programa na odeljenju Asistirane reproduktivne tehnologije na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog Centra Srbije tokom perioda od 2 godine (2010. i 2011. godina). Uslovi za uključivanje u studiju su bili: postupak odobren od strane Komisije za VTO za uključivanje u Nacionalni program, starost žene manja od 40 godina, indeks telesne mase $<30 \text{ kg/m}^2$, trajanje infertiliteta duže od godinu dana, postojanje regularnih menstrualnih ciklusa na 24 do 35 dana, nalaz histerosalpingografije ili histeroskopije uz transvaginalni ultrasonografski nalaz uterusa bez anomalija koje bi remetile funkciju, transvaginalni ultrasonografski nalaz postojanja i adekvatne vizuelizacije oba jajnika bez vidljivih patoloških promena, vrednost FSH drugog ili trećeg dana ciklusa pre započinjanja stimulacije $< 15 \text{ mIU/ml}$; prisustvo spermatozoida u ejakulatu muškarca; kao i da par nema zajedničke dece.

Starost, indeks telesne mase (BMI), uzrok i vrsta infertiliteta su određeni za sve učesnike u studiji. Indeks telesne mase je definisan kao težina u kilogramima podeljena sa visinom u metrima na kvadrat (kg/m^2). Uzrok infertiliteta je određen kao tubarni, ovarijalni, endometrioza, imunološki, muški, nepoznat ili kombinovan. Vrsta infertiliteta je određena kao primarni i sekundarni.

Transvaginalnim ultrazvukom pregledom drugog ili trećeg dana menstrualnog ciklusa pre započinjanja stimulacije ovulacije je određen broj antralnih folikula, odnosno ukupan broj folikula veličine od 2 do 7 mm na oba ovarijuma. Svim pacijentkinjama jedrugog ili trećeg dana menstrualnog ciklusa pre započinjanja stimulacije ovulacije bila merena vrednost FSH, LH, estradiola, progesterona,

testosterona, inhibina B i AMH. Uzorci krvi su uzimani Vacutainer epruvetama (BD Vacutainer Systems) i centrifugirani prema uputstvu proizvođača za dobijanje uzoraka seruma. Vrednost AMH ($1 \text{ ng/ml} = 7.14 \text{ pmol/l}$; Gen II ELISA ref. no. A79765; Beckman Coulter) i inhibina B (Gen II ELISA ref. no. A81303; Beckman Coulter) u serumu je merena ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) testom. Nivo vrednosti AMH je određen kao nizak ($< 1 \text{ ng/ml}$), normalan ($1\text{-}5 \text{ ng/ml}$) i visok ($>5 \text{ ng/ml}$). Vrednosti FSH, LH, estradiola, progesterona i testosterona su analizirane hemiluminescentnim imunoesejmom (Access 2 immunoassay system, Beckman Coulter). Na osnovu vrednosti FSH i LH je određen FSH/LH odnos.

Stimulacija ovulacije je vršena prema tri različita protokola. U dugom protokolu, supresija hipofize je započeta primenom GnRH agonista triptorelina (Diphereline, Ferring Pharmaceuticals) u dozi 0.1 mg dnevno 7 dana pre početka ciklusa i nastavljena svakodnevno do kraja stimulacije ovulacije. Davanje gonadotropina (follitropin alfa – Gonal F, Merck Serono; ili follitropin beta – Puregon, MSD; ili menotropin – Menopur, Ferring Pharmaceuticals) je po injalo drugog ili trećeg dana ciklusa u fiksnoj dozi od 225 i.j. dnevno tokom prvih 5 dana kontrolisane ovarijalne hiperstimulacije, a zatim je u zavisnosti od ovarijalnog odgovora korigovana doza.

U kratkom protokolu stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, primena triptorelina u dozi 0.1 mg dnevno je započeta drugog ili trećeg dana ciklusa i nastavljena svakodnevno do kraja stimulacije ovulacije, dok je davanje gonadotropina po injalo sledećeg dana u fiksnoj dozi od 150 i.j. dnevno tokom prvih 5 dana kontrolisane ovarijalne hiperstimulacije, a zatim je u zavisnosti od ovarijalnog odgovora korigovana doza. Kratki protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima je podrazumevao primenu gonadotropina po ev od drugog ili trećeg dana ciklusa u dozi od 150 i.j. dnevno tokom prvih 5 dana kontrolisane ovarijalne hiperstimulacije, a

zatim je u zavisnosti od ovarijalnog odgovora korigovana doza i od 6. dana stimulacije započinje primena cetrotreksa (Cetrotide, Merck Serono) u dozi od 0.25 mg dnevno i nastavljena svakodnevno do završetka ovarijalne stimulacije.

Kriterijum za davanje horigonadina (Pregnyl, Organon) u dozi od 5.000 do 10.000 IU je bilo postojanje najmanje dva folikula veća od 16 mm i vrednost estradiola veća od 400 pg/ml. Punkcija folikularne aspiracije oocita je vršena 34 - 36 sati posle aplikacije horigonadina, transvaginalnim putem, a zatim je primenjena IVF ili ICSI metoda asistiranе fertilizacije. Posle embriokulture u medicinskim komercijalnim medijumima, transfer embriona je vršen Labotect kateterima od drugog do petog dana posle aspiracije.

Ovarijalni odgovor na stimulaciju je procenjen prema broju oocita dobijenih aspiracijom i definisan kao loš (≤ 4 oocite), adekvatan (5 – 15 oocita) i prekomeran (> 15 oocita). Kvalitet dobijenih oocita je procenjen na osnovu nivoa maturacije i procenta zastupljenih nezrelih oocita (manje ili više od 20 %). Registrovana je i pojava sindroma ovarijalne hiperstimulacije (OHSS), i to drugog i trećeg stepena.

Pojava biohemijske trudnoće je registrovana nalazom povišenih vrednosti β -hCG u serumu 14 dana posle embriotransfera, dok je pojava kliničke trudnoće registrovana ultrasonografskim pregledom 4 nedelje posle embriotransfera.

Analiza podataka je urađena metodama deskriptivne i analitičke statistike. Podaci za kontinuirane varijable su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom (IQR). Kategorijalni podaci su prikazani kao apsolutni brojevi sa procentima. Razlike u ispitivanim parametrima su analizirane Kruskal-Wallis-ovim neparametarskim testom uz Mann Whitney test za međugrupna poređenja. Za formiranje konačnog modela u primenjenim različitim protokolima stimulacije su korišćene univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza (za dugi i kratak protokol uz supresiju sa

GnRH agonistima; za kratak protokol uz supresiju sa GnRH antagonistima model nije ra en zbog nedovoljnog broja ispitanika). Za procenu dijagnosti ke ta nosti testova koriš en je ROC (Receiver Operating Characteristics) metod, uz odre ivanje senzitivnosti i specifi nosti za optimalne ta ke preseka (cut-off vrednosti) potencijalnih prediktora. Tako e, izra unata je površina ispod krive (AUC) kao kvantitativna mera prediktivne vrednosti testova. Nivo statisti ke zna ajnosti je bio $p < 0.05$. Dobijeni podaci su analizirani SPSS IBM 21.0 softverom.

REZULTATI

1. KARAKTERISTIKE ISPITIVANE POPULACIJE

Ispitivanjem je obuhvaćeno 363 žene sa medijanom godina starosti 35.0 sa interkvartilnim opsegom 32.0-37.0 godina, i medijanom indeksa telesne mase medijane 22.0(IQR= 20.4-24.2)kg/m². Medijana broja antralnih folikula je bila 12(IQR=8-18). Medijana vrednosti AMH je bila 2.04(IQR=0.80-3.80) ng/ml, pri čemu je vrednost definisana kao nisku imalo 27.5%, normalnu vrednost je imalo 57.9%, a visoku vrednost 14.6% ispitivanih žena. Bazalne vrednosti hormona su bile: medijana FSH 6.80 (IQR= 5.50-8.20) mIU/ml, medijana LH 4.70 (IQR= 3.50-6.30) mIU/ml, medijana estradiola 58.2(IQR 40.4-102.0) pg/ml, medijana progesterona 1.02(IQR 0.50-2.40) ng/ml, medijana testosterona 1.19 (IQR= 0.62-1.90) nmol/l, medijana inhibin B 25.25(IQR 15.90-51.20) pg/ml. Medijana odnosa FSH/LH je iznosila 1.47(IQR 1.06-1.97). Kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima je primenjen kod 158 ispitanica; dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima kod 181 ispitanice; i kratak protokol uz supresiju GnRH antagonistima kod 24 ispitanice. Medijana trajanja stimulacije je bila 10 (IQR= 9-11) dana (Tabela 1).

Tabela 1. Osnovne kliničke karakteristike ispitivane populacije

Varijable	Med (IQR)
Starost, godine	35.0(32.0-37.0)
BMI, kg/m ²	22.0(20.4-24.2)
AFC, broj	12(8-18)
AMH, ng/ml	2.04(0.80-3.80)
AMH nivo, n(%)	
Nizak	100(27.5%)
Normalan	210(57.9%)
Visok	53(14.6%)
E2, pg/ml	58.2(40.4-102.0)
Progesterone, ng/ml	1.02(0.50-2.40)
FSH, mIU/ml	6.80(5.50-8.20)
LH, mIU/ml	4.70(3.50-6.30)
FSH/LH	1.47(1.06-1.97)
Testosteron, nmol/l	1.19(0.62-1.90)
Inhibin B, pg/ml	25.25(15.90-51.20)
Protokol stimulacije	
kratak sa GnRH agonistima	158
dugi sa GnRH agonistima	181
kratak sa GnRH antagonistima	24
Trajanje stimulacije, broj dana	10(9-11)

Primarni infertilitet je imalo 266 (73.3%) ispitanika, od čega je njih 136 tretirano dugim protokolom, 118 kratkim protokolom uz supresiju GnRH agonistima, i 13 kratkim protokolom uz supresiju GnRH antagonistima. Sekundarni infertilitet je imalo 97 (26.7%) ispitanika, od čega je njih 45 tretirano dugim protokolom, 40 kratkim protokolom uz supresiju GnRH agonistima, i 11 kratkim protokolom uz supresiju GnRH antagonistima.

Od uzroka infertiliteta, najzastupljeniji je bio muški uzrok kod 114 (31.4%) ispitanika, zatim slede nepoznat uzrok kod 87 (24.0%) i tubarni uzrok kod 84 (23.1%) ispitanika. Kombinovan uzrok infertiliteta je nađen kod 47 (12.9%) ispitanika,

ovarijalni uzrok kod 15 (4.1%), endometrioza kod 12 (3.3%) i imunološki uzrok kod 4 (1.1%) ispitanika (Tabela 2).

Tabela 2. Zastupljenost vrsta i uzroka infertiliteta u primenjenim protokolima stimulacije

Kategorija		Broj	%	Kratak protokol sa GnRH agonistima	Kratak protokol sa GnRH antagonistima	Dugi protokol sa GnRH agonistima
Vrsta infertiliteta	Primarni	266	73.3	118	13	136
	Sekundarni	97	26.7	40	11	45
Uzrok infertiliteta	Muški	114	31.4	48	5	61
	Tubarni	84	23.1	33	3	48
	Ovarijalni	15	4.1	8	0	7
	Endometrioza	12	3.3	4	1	7
	Imunološki	4	1.1	2	0	2
	Nepoznat	87	24.0	46	8	33
	Kombinovani	47	12.9	17	7	23

5. KARAKTERISTIKE ISPITIVANE POPULACIJE PREMA PRIMENJENIM PROTOKOLIMA KONTROLISANE OVARIJALNE STIMULACIJE

Kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima je primenjen kod ukupno 158 ispitanica sa medijanom godina starosti 35.0 sa interkvartilnim opsegom 32.7-38.0 godina i medijanom BMI 21.6 (IQR=20.2-23.9) kg/m². Medijana trajanja stimulacije je bila 9 (IQR=8-10) dana. Medijana broja antralnih folikula na po etku stimulacije je bila 11.5 sa interkvartilnim opsegom 7.0-16.25. Medijana vrednosti AMH je bila 1.65 (IQR=0.69-3.28) ng/ml, pri emu je 97 (61.4%) ispitanica imalo vrednosti definisane kao normalne, 47 (29.7%) niske, i 14 (8.9%) visoke vrednosti. Bazalne vrednosti hormona su bile: medijana FSH 6.73 (IQR= 5.75-8.20) mIU/ml, medijana LH 4.69 (IQR= 3.75-6.45) mIU/ml, medijana estradiola 55.2 (IQR=39.6-95.1) pg/ml, medijana progesterona 1.03 (IQR=0.50-2.50) ng/ml, medijana

testosterona 0.99 (IQR= 0.45-1.90), medijana inhibina B 30.6 (IQR=15.8-49.9) pg/ml. Medijana odnosa FSH/LH je iznosila 1.47 (IQR=1.05-2.00).

Dugim protokolom stimulacije uz supresiju GnRH agonistima je tretirano ukupno 181 ispitanica sa medijanom godina starosti 34.0 sa interkvartilnim opsegom 31.0-36.0 godina, imedijanom BMI 22.0 (IQR=20.5-24.4) kg/m². Medijana trajanja stimulacije je bila 11 (IQR=10-12) dana. Medijana broja antralnih folikula na po etku stimulacije je bila 13.0 (IQR= 9.0-20.0). Medijana vrednosti AMH je bila 2.60 (IQR=1.0-4.75) ng/ml, pri emu je 100 (55.2%) ispitanica imalo vrednosti definisane kao normalne, 43 (23.8%) niske, i 38 (21.0%) visoke vrednosti. Bazalne vrednosti hormona su bile: medijana FSH 6.76 (IQR= 5.23-8.05) mIU/ml, medijana LH 4.70 (IQR= 3.30-6.17) mIU/ml, medijana estradiola 55.2 (IQR=39.6-95.1) pg/ml, medijana progesterona 1.13 (IQR=0.54-2.50) ng/ml, medijana testosterona 1.29 (IQR= 0.69-2.10) nmol/l, medijana inhibina B 24.9 (IQR=16.7-51.5) pg/ml. Medijana odnosa FSH/LH je iznosila 1.46 (IQR=1.07-1.96).

Kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima je primenjen kod 24 ispitanice sa medijanom godina starosti 35.5 sa interkvartilnim opsegom 33.3-37.0 godina, i medijanom BMI 22.1 (IQR=21.2-24.0) kg/m². Trajanje stimulacije je bilo medijane 9 (IQR=9-10) dana. Medijana broja antralnih folikula na po etku stimulacije je bila 10.5 (IQR= 7.25-12.75). Medijana vrednosti AMH je bila 1.15 (IQR=0.25-1.95) ng/ml, pri emu je 13 (54.2%) ispitanica imalo vrednost definisanu kao normalnu, 10 (41.7%) nisku, i 1 (4.2%) visoke vrednosti. Bazalne vrednosti hormona su bile: medijana FSH 7.78 (IQR= 6.66-9.87) mIU/ml, medijana LH 4.61 (IQR= 3.81-7.52) mIU/ml, medijana estradiola 54.1 (IQR=41.7-80.8) pg/ml, medijana progesterona 0.76 (IQR=0.38-1.52) ng/ml, medijana testosterona 0.96 (IQR= 0.72-1.80) nmol/l,

medijana inhibina B 27.8(IQR=13.0-57.5) pg/ml. Medijana odnosa FSH/LH je iznosila 1.68(IQR=1.15-1.96).

Me ugrupnim pore enjem dobijena je visoko statisti ki zna ajna razlika ($p < 0.001$) izme u grupa u:

- godinama starosti - ispitanice iz grupe u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije su bile statisti ki zna ajno mla e u odnosu na grupu kod koje je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima kao i u odnosu na grupu kod koje je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima;
- danima stimulacije - stimulacija je trajala statisti ki zna ajno duže kod ispitanica kod kod kojih je primenjen dugi protokol stimulacije u odnosu na grupu kod koje je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima kao i u odnosu na grupu kod koje je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima;
- broju antralnih folikula - broj antralnih folikula je bio statisti ki zna ajno ve i u grupi kod koje je primenjen dugi protokol stimulacije u odnosu na grupu kod koje je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima kao i u odnosu na grupu kod koje je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima;
- vrednosti FSH – vrednosti FSH su bile statisti ki zna ajno ve e u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol uz supresiju GnRH antagonistima u odnosu na grupu u kojoj je primenjen dugi protokol sa GnRH agonistima i na grupu u kojoj je primenjen kratak protokol uz supresiju GnRH agonistima; i
- vrednosti AMH - vrednosti AMH su bile statisti ki zna ajno ve eu grupi kod koje je primenjen dugi protokol stimulacije u odnosu na grupu kod koje je

primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima kao i u odnosu na grupu kod koje je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima a tako e, vrednosti AMH su bile statisti ki zna ajno ve e u grupi kod koje je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima u odnosu na grupu kod koje je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima. (Tabela 3).

Tabela 3. Osnovne klini ke karakteristike ispitivane populacije prema primenjenim protokolima stimulacije

Varijable	Kratak protokol	Dugi protokol sa	Kratki protokol	P	post-hoc
	sa GnRH agonistima (n=158)	GnRH agonistima (n=181)	sa GnRH antagonistima (n=24)		
Starost, godine	35.0(32.7-38.0)	34.0(31.0-36.0)	35.5(33.2-37.0)	<0.001	S-L;L-A
BMI, kg/m ²	21.6(20.2-23.9)	22.0(20.5-24.4)	22.1(21.2-24.0)	0.419	
AMH, ng/ml	1.65(0.69-3.28)	2.60(1.0-4.75)	1.15(0.25-1.95)	<0.001	S-L;L-A;S-A
AMH nivo, n(%)					
Nizak	47(29.7%)	43(23.8%)	10(41.7%)		
Normalan	97(61.4%)	100(55.2%)	13(54.2%)		
Visok	14(8.9%)	38(21.0%)	1(4.2%)		
AFC, broj	11.5(7.0-16.25)	13.0(9.0-20.0)	10.5(7.25-12.75)	<0.001	S-L;L-A
E2, pg/ml	55.2(39.6-95.1)	55.2(39.6-95.1)	54.1(41.7-80.8)	0.648	
Progesterone, ng/ml	1.03(0.50-2.50)	1.13(0.54-2.50)	0.76(0.38-1.52)	0.258	
FSH, mIU/ml	6.73(5.75-8.20)	6.76(5.23-8.05)	7.78(6.66-9.87)	0.015	L-A;S-A
LH, mIU/ml	4.69(3.57-6.45)	4.70(3.30-6.17)	4.61(3.81-7.52)	0.582	
FSH/LH, mIU/ml	1.47(1.05-2.00)	1.46(1.07-1.96)	1.68(1.15-1.96)	0.575	
Testosteron, nmol/l	0.99(0.45-1.90)	1.29(0.69-2.10)	0.96(0.72-1.80)	0.185	
Inhibin B, pg/ml	30.6(15.8-49.9)	24.9(16.7-51.5)	27.8(13.0-57.5)	0.961	
Dani stimulacije, broj	9(8-10)	11(10-12)	9(9-10)	<0.001	S-L;L-A

S – kratak protokol sa GnRH agonistima; L – dugi protokol sa GnRH agonistima; A – kratak protokol sa GnRH antagonistima

3. PREDIKTORI BROJA DOBIJENIH OOCITA

Medijana broja dobijenih oocita u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima je bila 6, sa interkvartilnim opsegom 3 – 9.

U grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, medijana broja dobijenih oocita je bila 11, sa interkvartilnim opsegom 6 – 15. Medijana broja dobijenih oocita u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol uz supresiju GnRH antagonistima je bila 6, sa interkvartilnim opsegom 4 – 8. Me ugrupnim pore enjem na ena je visoko statisti ki zna ajna razlika ($p < 0.001$) u broju dobijenih oocita izme u grupa, tj. broj dobijenih oocita u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima je bio zna ajno ve i u odnosu na grupu u kojoj je primenjen kratak protokol uz supresiju GnRH agonistima kao i grupu u kojoj je primenjen kratak protokol uz supresiju GnRH antagonistima.

Loš ovarijalni odgovor je imalo 50 (32.9%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, 26 (14.4%) u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i 10 (43.5%) u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol uz supresiju GnRH antagonistima. Adekvatan ovarijalni odgovor je imalo 92 (60.5%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, 113 (62.8%) u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i 12 (52.2%) u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol uz supresiju GnRH antagonistima.

Prekomeran ovarijalni odgovor je imalo 10 (6.6%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, 41 (22.8%) u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i 1 (4.3%) u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol uz supresiju GnRH antagonistima.

Me ugrupnim pore enjem je na ena visoko statisti ki zna ajna razlika ($p<0.001$) izme u grupa u adekvatnom ovarijalnom odgovoru. U grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima je bilo zna ajno više ispitanica kod kojih je dobijen adekvatan ovarijalni odgovor u odnosu na druge dve grupe.

Više od 20% nezrelih oocita je bilo kod 39 (25.7%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, kod 51 (28.3%) u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i kod 9 (39.1%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol uz supresiju GnRH antagonistima, bez statisti ki zna ajne razlike izme u grupa ($p=0.399$).

Sindrom ovarijalne hiperstimulacije je imalo 5 (3.2%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, 32 (17.7%) u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i 1 (4.2%) u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol uz supresiju GnRH antagonistima. Me ugrupnim pore enjem na ena je visoko statisti ki zna ajna razlika ($p<0.001$) izme u prve dve grupe, odnosno u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije bilo je zna ajno više ispitanica sa sindromom ovarijalne hiperstimulacije u odnosu na grupu u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima. (Tabela 4)

Tabela 4. Ovarijalni odgovor prema primjenjenom protokolu stimulacije

Varijable	Kratak protokol sa GnRH agonistima (n=158)	Dugi protokol sa GnRH agonistima (n=181)	Kratki protokol sa GnRH antagonistima (n=24)	P	post-hoc
Broj dobijenih oocita	6(3-9)	11(6-15)	6(4-8)	<0.001	S-L;L-A
Ovarijalni odgovor					
Loš (<5 oocita)	50(32.9%)	26(14.4%)	10(43.5%)		
Adekvatan	92(60.5%)	113(62.8%)	12(52.2%)	<0.001	S-L;L-A
Prekomeran (>15)	10(6.6%)	41(22.8%)	1(4.3%)		
Nezrelih oocita>20%	39(25.7%)	51(28.3%)	9(39.1%)	0.399	
OHSS	5(3.2%)	32(17.7%)	1(4.2%)	<0.001	S-L

S – kratak protokol sa GnRH agonistima; L – dugi protokol sa GnRH agonistima; A – kratak protokol sa GnRH antagonistima

U univarijantnoj logisti koj regresionoj analizi, kao zna ajni prediktori adekvatnog broja dobijenih oocita u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, identifikovani su: starost (p=0.003; RR=0.808; 95% CI za RR=0.701-0.931), broj antralnih folikula (p<0.001; RR=1.488, 95% CI za RR=1.265-1.750), AMH (p=0.001; RR=1.557, 95% CI za RR=1.190-2.036) i odnos FSH/LH (p=0.009; RR=0.533; 95% CI za RR=0.333-0.854). Multivarijantnom logisti kom regresijom, kao najzna ajniji prediktor adekvatnog broja dobijenih oocita u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, identifikovan je broj antralnih folikula (p<0.001; RR=1.488, 95% CI za RR=1.265-1.750).

U grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, kao zna ajni prediktori prekomernog broja dobijenih oocita, univarijantnom logisti kom regresionom analizom identifikovani su: starost (p=0.003; RR=0.863; 95% CI za RR=0.784-0.950), broj antralnih folikula (p<0.001; RR=1.282, 95% CI za RR=1.164-1.412), AMH (p<0.001; RR=1.304, 95% CI za RR=1.153-1.476) i odnos

FSH/LH ($p=0.044$; $RR=0.567$; 95% CI za $RR=0.327-0.986$). Multivarijantnom logisti kom regresijom, kao najzna ajniji prediktor prekomernog broja dobijenih oocita u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, identifikovan je broj antralnih folikula ($p<0.001$; $RR=1.282$, 95% CI za $RR=1.164-1.412$).

U univarijantnoj logisti koj regresionoj analizi, kao zna ajni prediktori adekvatnog broja dobijenih oocita u grupi u kojoj je primenjen kratki protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, identifikovani su: starost ($p=0.009$; $RR=0.872$; 95% CI za $RR=0.786-0.967$), broj antralnih folikula ($p<0.001$; $RR=1.301$, 95% CI za $RR=1.182-1.432$), AMH ($p=0.007$; $RR=1.363$, 95% CI za $RR=1.087-1.709$) i odnos FSH/LH ($p=0.022$; $RR=0.633$; 95% CI za $RR=0.428-0.936$). Multivarijantnom logisti kom regresijom, kao najzna ajniji prediktor adekvatnog broja dobijenih oocita u grupi u kojoj je primenjen kratki protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, identifikovan je broj antralnih folikula ($p<0.001$; $RR=1.301$, 95% CI za $RR=1.182-1.432$). (Tabela 5)

Tabela 5. Prediktori ovarijalnog odgovora u primenjenim protokolima stimulacije

Varijable	Univarijantna logisti ka regresija			Multivarijantna logisti ka regresija		
	P	RR	95%CI za RR	P	RR	95%CI za RR
<i>Dugi protokol sa GnRH agonistima– adekvatan ovarijalni odgovor</i>						
Starost, godine	0.003	0.808	0.701-0.931			
AFC	<0.001	1.488	1.265-1.750	<0.001	1.488	1.265-1.750
AMH,ng/ml	0.001	1.557	1.190-2.036			
FSH/LH, mIU/ml	0.009	0.533	0.333-0.854			
<i>Dugi protokol sa GnRH agonistima– prekomeran ovarijalni odgovor</i>						
Starost, godine	0.003	0.863	0.784-0.950			
AFC	<0.001	1.282	1.164-1.412	<0.001	1.282	1.164-1.412
AMH,ng/ml	<0.001	1.304	1.153-1.476			
FSH/LH mIU/ml	0.044	0.567	0.327-0.986			
<i>Kratki protokol sa GnRH agonistima– adekvatan ovarijalni odgovor</i>						
Starost, godine	0.009	0.872	0.786-0.967			
AFC	<0.001	1.301	1.182-1.432	<0.001	1.301	1.182-1.432
AMH,ng/ml	0.007	1.363	1.087-1.709			
FSH/LH mIU/ml	0.022	0.633	0.428-0.936			

U ROC analizi određene su tačke preseka (cut-off) za AMH i broj antralnih folikula u predikciji broja dobijenih oocita. Za AMH, u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, određena je cut-off vrednost od 1.5 za adekvatan broj dobijenih oocita, za koju je senzitivnost bila 63% i specifičnost 64% (površina ispod ROC krive 0.683); u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, određena je cut-off vrednost od 1.9 za adekvatan broj dobijenih oocita, za koju je senzitivnost bila 67% i specifičnost 69% (površina ispod ROC krive 0.728); i cut-off vrednost od 3.3 za prekomeran broj dobijenih oocita, za koju je senzitivnost bila 71% i specifičnost 69% (površina ispod ROC krive 0.717).

Za broj antralnih folikula, u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, određena je cut-off vrednost od >9 za adekvatan broj dobijenih oocita, za koju je senzitivnost bila 75% i specifičnost 66% (površina ispod

ROC krive 0.814); u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, određena je cut-off vrednost od >9 za adekvatan broj dobijenih oocita, za koju je senzitivnost bila 84% i specifičnost 85% (površina ispod ROC krive 0.874); i cut-off vrednost od >14 za prekomeran broj dobijenih oocita, za koju je senzitivnost bila 83% i specifičnost 65% (površina ispod ROC krive 0.787) (Tabela 6).

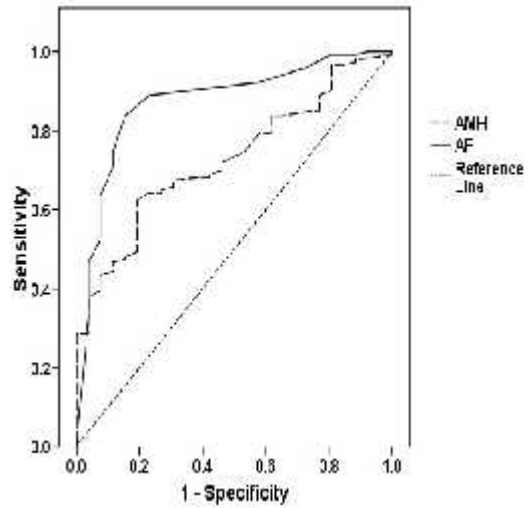
Tabela 6. ROC analiza broja antralnih folikula i AMH u predikciji broja dobijenih oocita

Varijable	Protokol	Ovarijalni odgovor	Površina			
			ispod krive	Cut-off	Sn	Sp
AMH, ng/ml	Kratak protokol sa GnRH agonistima	Adekvatan	0.683	1.5	63%	64%
	Dugi protokol sa GnRH agonistima	Adekvatan	0.728	1.9	67%	69%
		Prekomeran	0.717	3.3	71%	69%
Broj antralnih folikula	Kratak protokol sa GnRH agonistima	Adekvatan	0.814	> 9	75%	66%
	Dugi protokol sa GnRH agonistima	Adekvatan	0.874	> 9	84%	85%
		Prekomeran	0.787	> 14	83%	65%

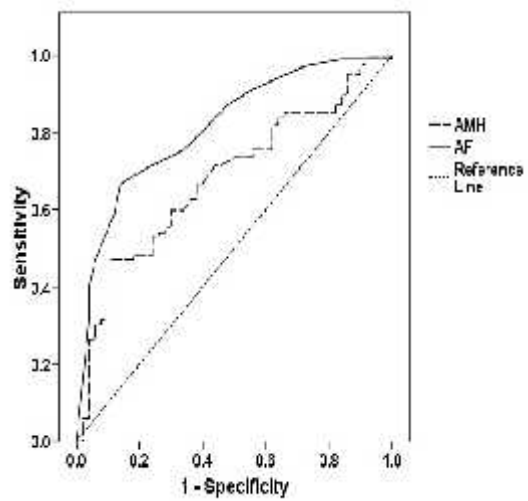
Grafici prikazano, poređenje pouzdanosti vrednosti AMH i broja antralnih folikula u predikciji adekvatnog broja dobijenih oocita u primenjenim protokolima (Grafikon 1) kao i u predikciji prekomernog broja dobijenih oocita u dugom protokolu stimulacije uz supresiju sa GnRH agonistima (Grafikon 2), pokazuje da je broj antralnih folikula pouzdaniji prediktor i adekvatnog i prekomernog ovarijalnog odgovora na stimulaciju, nezavisno od primenjenog protokola.

Grafikon 1. Pore enje pouzdanosti vrednosti AMH i broja antralnih folikula u predikciji adekvatnog broja dobijenih oocita u primenjenim protokolima

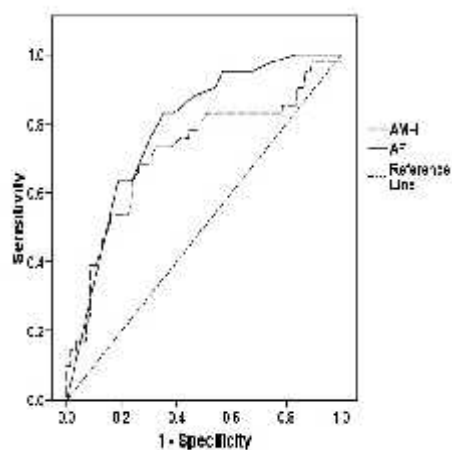
a) Kratak sa GnRH agonistima



b) Dugi sa GnRH agonistima



Grafikon 2. Pore enje pouzdanosti vrednosti AMH i broja antralnih folikula u predikciji prekomernog broja dobijenih oocita u dugom protokolu stimulacije uz supresiju GnRH agonistima



4. PREDIKCIJA BROJA I KVALITETA EMBRIONA

Fertilizaciju je imalo 140 (92.1%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, 174 (96.7%) u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i 21 (91.3%) u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima, bez statistički značajne razlike između grupa ($p=0.161$).

Medijana ukupnog broja dobijenih embriona u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima je bila 3 (IQR= 2-5.75); u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, medijana ukupnog broja embriona je bila 5 (IQR= 3-9) i u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima, medijana ukupnog broja embriona je bila 3 (IQR= 1.5-4.5). Međugrupnim poređenjem na ovaj način je visoko statistički značajna razlika ($p<0.001$) u ukupnom broju embriona, odnosno ispitanice u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije imale su značajno više

embriona u odnosu na ispitanice u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima.

Embrione klase "A" je imalo 76 (54.3%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima; 99 (56.9%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i 16 (76.2%) u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima, bez statistički značajne razlike između grupa ($p=0.167$).

Embrione klase "B" je imalo 108 (77.1%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima; 148 (85.1%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i 14 (66.7%) u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima, bez statistički značajne razlike između grupa ($p=0.053$).

Embriotransfer je urađen kod 139 (91.4%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, 172 (95.6%) u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i 21 (91.3%) u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima. Između grupa nije nađena statistički značajna razlika ($p=0.287$).

U grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, medijana broja embriona vraćenih embriotransferom je bila 2 (IQR= 2-3); u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, medijana broja vraćenih embriona je bila 3 (IQR= 3-3) i u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima, medijana broja embriona vraćenih embriotransferom je bila 3 (IQR= 1-3). Međugrupnim poređenjem, nađena je visoko statistički značajna razlika ($p<0.001$), odnosno ispitanice u grupi u

kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima su imale značajno više vršen zakonski maksimalno dozvoljen broj embriona (tri) u odnosu na ispitanice u druge dve grupe.

Embrioni klase "A" su vršeni embriotransferom kod 72 (51.8%) ispitanice u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, 95 (55.2%) u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i 16 (76.2%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima, bez statistički značajne razlike između grupa ($p=0.111$).

Embrioni klase "B" su vršeni embriotransferom kod 88 (63.3%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, 112 (65.1%) u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i 10 (47.6%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima, bez statistički značajne razlike između grupa ($p=0.292$) (Tabela 7).

Tabela 7. Zastupljenost broja i kvaliteta embriona prema primenjenim protokolima stimulacije u ispitivanoj populaciji

Varijable	Kratak protokol sa GnRH agonistima (n=158)	Dugi protokol sa GnRH agonistima (n=181)	Kratki protokol sa GnRH antagonistima (n=24)	P	post-hoc
Fertilizacija	140(92.1%)	174(96.7%)	21(91.3%)	0.161	
Broj embriona	3(2-5.75)	5(3-9)	3(1.5-4.5)	<0.001	S-L;L-A
Klasa embriona					
A	76(54.3%)	99(56.9%)	16(76.2%)	0.167	
B	108(77.1%)	148(85.1%)	14(66.7%)	0.053	
Embriotransfer	139(91.4%)	172(95.6%)	21(91.3%)	0.287	
Broj ET embriona	2(2-3)	3(3-3)	3(1-3)	<0.001	S-L;L-A
Klasa ET embriona					
A	72(51.8%)	95(55.2%)	16(76.2%)	0.111	
B	88(63.3%)	112(65.1%)	10(47.6%)	0.292	

S – kratak protokol sa GnRH agonistima; L – dugi protokol sa GnRH agonistima; A – kratak protokol sa GnRH antagonistima

U univarijantnoj logističkoj regresionoj analizi, normalan nivo AMH je bio značajan prediktor embriona klase “A” u odnosu na nizak ($p=0.033$; $RR= 2.251$; 95%CI za $RR= 1.069-4.742$; za dugi protokol stimulacije i $p=0.054$; $RR= 2.083$; 95%CI za $RR= 0.989-4.389$; za kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima), dok visok nivo AMH nije bio značajan prediktor embriona klase “A” u odnosu na nizak ($p=0.070$; $RR= 2.319$; 95%CI za $RR= 0.934-5.760$; za dugi protokol stimulacije i $p=0.315$; $RR= 1.944$; 95%CI za $RR= 0.531-7.119$; za kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima) (Tabela 8).

Tabela 8. Prediktori embriona klase “A” u ispitivanim protokolima stimulacije

Varijable	Univarijantna logisti ka regresija		
	P	RR	95%CI za RR
<i>Dugi protokol sa GnRH agonistima</i>			
AMH nivo			
Normalan vs nizak	0.033	2.251	1.069-4.742
Visok vs nizak	0.070	2.319	0.934-5.760
<i>Kratki protokol sa GnRH agonistima</i>			
AMH nivo			
Normalan vs nizak	0.054	2.083	0.989-4.389
Visok vs nizak	0.315	1.944	0.531-7.119

5. PREDIKCIJA BIOHEMIJSKIH I KLINI KIH TRUDNO A

Biohemijsku trudno u je imalo 54 (38.8%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, 68 (39.5%) u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i 11 (52.4%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima, bez statisti ki zna ajne razlike izme u grupa ($p=0.489$).

Do klini ke trudno e je došlo kod 50 (36.0%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, 65 (37.8%) u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima i 11 (52.4%) ispitanica u grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima. Izme u grupa nije na ena statisti ki zna ajna razlika u broju klini kih trudno a ($p=0.352$). (Tabela 9).

Tabela 9. Zastupljenost trudno e prema koriš enim protolima stimulacije u ispitivanoj populaciji

Varijable	Kratak protokol sa GnRH agonistima (n=158)	Dugi protokol sa GnRH agonistima (n=181)	Kratki protokol sa GnRH antagonistima (n=24)	p	post-hoc
Biohemijska trudno a	54(38.8%)	68(39.5%)	11(52.4%)	0.489	
Klini ka trudno a	50(36.0%)	65(37.8%)	11(52.4%)	0.352	

U univarijantnoj logisti koj regresionoj analizi, u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, kao zna ajni prediktor biohemijske i klini ke trudno e identifikovana je vrednost FSH (p=0.034; RR=1.176; 95% CI za RR=1.013-1.365 za biohemijske trudno e i p=0.039; RR=1.171; 95% CI za RR=1.008-1.360 za klini ke trudno e).

U grupi u kojoj je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima, univarijantnom logisti kom regresionom analizom, kao zna ajni prediktori biohemijske i klini ke trudno e identifikovani su: starost (p=0.005; RR=0.862; 95% CI za RR=0.776-0.957 za biohemijske trudno e i p=0.002; RR=0.840; 95% CI za RR=0.753-0.936 za klini ke trudno e); vrednost FSH (p=0.090; RR=0.883; 95% CI za RR=0.765-1.020 za biohemijske trudno e i p=0.064; RR=0.866; 95% CI za RR=0.744-1.008 za klini ke trudno e); vrednost testosterona (p=0.052; RR=1.410; 95% CI za RR=0.996-1.996 za biohemijske trudno e i p=0.032; RR=1.470; 95% CI za RR=1.034-2.089 za klini ke trudno e); vrednost AMH (p=0.002; RR=1.382; 95% CI za RR=1.129-1.691 za biohemijske trudno e i p=0.001; RR=1.411; 95% CI za RR=1.149-1.732 za klini ke trudno e) i broj antralnih folikula (p=0.002; RR=1.111; 95% CI za RR=1.039-1.189 za biohemijske trudno e i p<0.001; RR=1.137; 95% CI za RR=1.060-1.220 za klini ke trudno e). U multivarijantnoj

logisti koj regresionoj analizi, kao najznačajniji prediktor biohemijske trudnoće identificovana je vrednost AMH ($p=0.002$; $RR=1.382$; 95% CI za $RR=1.129-1.691$); a kao najznačajniji prediktori kliničke trudnoće identificovani su: starost ($p=0.022$; $RR=0.876$; 95% CI za $RR=0.782-0.981$) i broj antralnih folikula ($p=0.005$; $RR=1.111$; 95% CI za $RR=1.033-1.196$). (Tabela 10).

Tabela 10. Prediktoribiohemijske i kliničke trudnoće u primenjenim protokolima stimulacije

Varijable	Univarijantna logisti ka regresija			Multivarijantna logisti ka regresija		
	P	RR	95%CI za RR	p	RR	95%CI za RR
<i>Dugi protokol sa GnRH agonistima–biohemijska trudnoća</i>						
FSH, mIU/ml	0.034	1.176	1.013-1.365			
<i>Dugi protokol sa GnRH agonistima–klinička trudnoća</i>						
FSH, mIU/ml	0.039	1.171	1.008-1.360			
<i>Kratki protokol sa GnRH agonistima– biohemijska trudnoća</i>						
Starost, god	0.005	0.862	0.776-0.957			
FSH, mIU/ml	0.090	0.883	0.765-1.020			
T, nmol/l	0.052	1.410	0.996-1.996			
AMH, ng/ml	0.002	1.382	1.129-1.691	0.002	1.382	1.129-1.691
AFC, broj	0.002	1.111	1.039-1.189			
<i>Kratki protokol sa GnRH agonistima– klinička trudnoća</i>						
Starost, god	0.002	0.840	0.753-0.936	0.022	0.876	0.782-0.981
FSH, mIU/ml	0.064	0.866	0.744-1.008			
T, nmol/l	0.032	1.470	1.034-2.089			
AMH ng/ml	0.001	1.411	1.149-1.732			
AFC, broj	<0.001	1.137	1.060-1.220	0.005	1.111	1.033-1.196

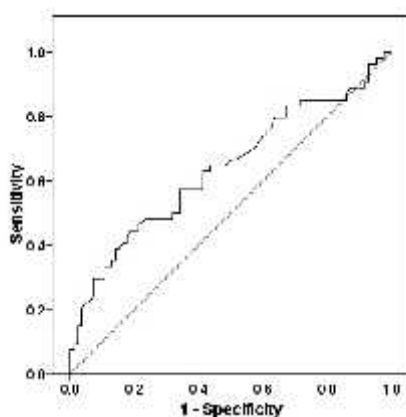
U ROC analizi određene su tačke preseka (cut-off) za AMH i broj antralnih folikula u predikciji biohemijske i kliničke trudnoće ispitanica kod kojih je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima. Za AMH, određena je cut-off vrednost od >2 za biohemijske trudnoće, za koju je senzitivnost bila 57% i specifičnost 65% (površina ispod ROC krive 0.639). Za broj antralnih folikula određena je cut-off vrednost od >11 za kliničke trudnoće, za koju je senzitivnost bila

68% i specifičnost 61% (površina ispod ROC krive 0.681) (Tabela 11 i Grafikon 3 i 4).

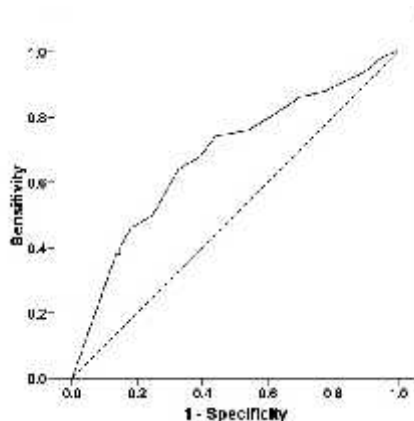
Tabela 11. ROC analiza AMH i broja antralnih folikula u predikciji biohemijske i kliničke trudnoće u kratkom protokolu stimulacije uz supresiju GnRH agonistima

Varijable	Protokol	Trudnoća	Površina	Cut-off	Sn	Sp
AMH, ng/ml	Kratak sa GnRH agonistima	Biohemijska	0.639	>2	57%	65%
Broj antralnih folikula	Kratak sa GnRH agonistima	Klinička	0.681	>11	68%	61%

Grafikon 3. ROC kriva za AMH u predikciji biohemijske trudnoće ispitanica kod kojih je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima



Grafikon 4. ROC kriva za broj antralnih folikula u predikciji kliničke trudnoće ispitanica kod kojih je primenjen kratak protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima



DISKUSIJA

Studijom je ispitana mogućnost predviđanja ovarijalnog odgovora na primenjenu stimulaciju, broja i kvaliteta embriona, kao i nastanka biohemijskih i kliničkih trudnoća posle primene postupaka asistiranе fertilizacije, na osnovu testova ovarijalne rezerve kod ispitanica kod kojih je primenjen neki od tri najčešće korišćena protokola kontrolisane ovarijalne hiperstimulacije. Pokazano je da mlađa životna dob, viši nivo AMH u serumu, niži odnos FSH/LH i veći broj antralnih folikula dovode do povećanja broja dobijenih oocita, kao i nastanka biohemijskih i kliničkih trudnoća. Broj antralnih folikula je bio najznačajniji prediktor ovarijalnog odgovora, nezavisno od primenjenog protokola. Normalna vrednost AMH je bila od značaja u predikciji nastanka kvalitetnih embriona. Na kraju, definisane su i tačke preseka za vrednosti AMH u serumu i broj antralnih folikula za adekvatan i prekomeran ovarijalni odgovor, kao i za nastanak biohemijskih i kliničkih trudnoća u različitim protokolima kontrolisane ovarijalne hiperstimulacije.

Kontrolisana ovarijalna hiperstimulacija je sastavni deo postupaka asistiranе fertilizacije i obično se primenjuje na uniforman standardizovan način, nezavisno od individualnih karakteristika pojedinog pacijenta. Većina ovih terapijskih protokola je veoma kompleksna, dugotrajna i skupa. Izbor određenog protokola stimulacije je zasnovan na odluci izabranog lekara za sprovođenje IVF postupka, a bazira se na prednostima i manama određenih terapijskih pristupa, i najvažnije, na empirijskoj proceni potencijalnog odgovora pacijenta na primenjenu stimulaciju. Empirijska procena je najčešće zasnovana na kliničkim karakteristikama pacijenta, u šta spadaju godine, indeks telesne mase, vrsta i uzrok infertiliteta, ishod prethodnih pokušaja asistiranе fertilizacije ukoliko ih je bilo uz primenjenu vrstu stimulacije, doze

gonadotropina i broj dobijenih oocita; kao i na parametrima ovarijalne rezerve, koji su prvi našli primenu u te svrhe i do danas su naj češće primenjivani – bazalne vrednosti FSH i estradiola (72,73). Iako je mnogo studija sprovedeno sa ciljem nalaženja odgovarajućeg protokola za pacijente sa lošim, optimalnim ili prekomernim ovarijalnim odgovorom, do sada nije postignut konsenzus, s obzirom da svaki od protokola ima i svoje prednosti i ograničenja (74).

Najvažnije loše strane naj češće primenjivanog dugog protokola uz supresiju sa GnRH agonistima uključuju duže trajanje stimulacije, potrebu za većim dozama gonadotropina, nastanak ovarijalnih cisti i menopauzalnog sindroma. Međutim, iako se primenom protokola stimulacije uz supresiju GnRH antagonistima mogu izbjeći ova neželjena dejstva, nedostatak ovog protokola je manja produkcija folikula (75). Dodatno, neke studije su pokazale i manje stope implantacije i trudnoće posle primene protokola sa GnRH antagonistima zbog niskih vrednosti LH i poremećene sekrecije estrogena (76). U poređenju sa pacijentima tretiranih protokolom sa GnRH antagonistima, kod pacijenata kod kojih je primenjen dugi protokol sa agonistima dobijen je značajno veći broj oocita posle aspiracije, uz veću produkciju zrelih oocita, dok je stopa prekinutih ciklusa bila slična (77–79). Veći broj dobijenih oocita posle primene dugog protokola sa agonistima sugerira da se primenom ovog protokola povećava i broj dobijenih embriona. Posledično, primena dugog protokola sa GnRH agonistima bi mogla biti od značaja za povećanje kumulativne stope trudnoća (74).

Nasuprot tome, neke studije su ukazale na značajno veći broj dobijenih oocita posle primene protokola sa GnRH antagonistima kod pacijenata sa lošim ovarijalnim odgovorom kod kojih je prethodno primenjen dugi protokol stimulacije sa GnRH agonistima (80). Više studija je povezalo primenu protokola sa antagonistima i prevenciju srednje teških i teških oblika sindroma ovarijalne hiperstimulacije (OHSS),

posebno kod žena sa sindromom policističnih ovarijuma, zbog brze supresije gonadotropina u ovom protokolu, uz kraće trajanje stimulacije, manje količine upotrebljenih gonadotropina, niže vrednosti estradiola na dan davanja hCG i nepromenjene stope trudnoća (81–83).

Polazeći od toga da je glavni cilj kontrolisane ovarijalne hiperstimulacije dobijanje većeg broja zrelih folikula sprečavanjem prevremenog skoka LH, primena dugog protokola sa GnRH agonistima dovodi do stvaranja većeg broja zrelih folikula u poređenju sa drugim protokolima stimulacije. Primena većih doza gonadotropina i duže trajanje tretmana u ovom protokolu navode mnoge kliničare na druge terapijske opcije. Međutim, dugi protokol stimulacije uz supresiju GnRH agonistima ima nesumnjivu prednost u dobijanju većeg broja oocita i embriona, koji mogu krioprezervacijom biti sačuvani za više embriotransfera sa odmrznutim embrionima, što dovodi do većih kumulativnih stopa trudnoća (74).

Nasuprot ovom “više je bolje” stavu, brojne studije ukazuju na to da je tokom poslednje decenije značajan pomak u bezbednosti pacijenata, kojima se rade postupci asistiranе reprodukcije, ostvaren razvojem brojnih hormonskih, sonografskih i funkcionalnih testova ovarijalne rezerve, pa prekomeran ovarijalni odgovor vezan sa rizikom od razvoja sindroma ovarijalne hiperstimulacije više nije prihvatljiv ishod (84).

Rezultati ove studije delimično potvrđuju ove nalaze. Ispitanice kod kojih je primenjen dugi protokol sa GnRH agonistima su bile statistički značajno mlađe u odnosu na ispitanice kod kojih je primenjen neki od druga dva protokola stimulacije, sa značajno višim vrednostima AMH i većim brojem antralnih folikula drugog dana ciklusa. Primenom ovog protokola, dobijen je značajno veći broj oocita, ali bez razlike u zastupljenosti zrelih oocita, uz značajno veći procenat ispitanica kod kojih je

došlo do razvoja sindroma ovarijalne hiperstimulacije II i III stepena – čak 17.7% u odnosu na 3.2% i 4.2% posle primene druga dva protokola stimulacije. Takođe, trajanje stimulacije je bilo značajno duže u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol. Posledično, ukupan broj embriona je bio značajno veći u grupi u kojoj je primenjen dugi protokol stimulacije u odnosu na grupe u kojima je primenjen neki od druga dva protokola stimulacije, ali morfološko gradiranje embriona nije pokazalo statistički značajnu razliku između grupa u broju embriona klase “A”. Dodatno, između grupa nije bilo statistički značajne razlike u stopama biohemijskih i kliničkih trudnoća.

Ovi nalazi upućuju na zaključak da bi se individualni pristup, posebno kod mlađih pacijentkinja, mogao bazirati na vrednostima AMH i broju antralnih folikula, što bi rezultovalo u zameni najčešće primenjivanog dugog protokola sa GnRH agonistima drugim terapijskim modalitetima, sa ciljem povećanja bezbednosti – smanjivanja rizika razvoja životno ugrožavajućeg sindroma ovarijalne hiperstimulacije kao i multiplih trudnoća, uz jednaku efikasnost u krajnjem ishodu – nastanku trudnoće. Rastući trend u svetu predstavlja paradoks “manje je više”, odnosno sve veća zastupljenost IVF ciklusa sa blagom stimulacijom ili iz spontanog, nestimulisanog ciklusa. Mogući mehanizmi kojima bi se objasnio paradoks “manje je više” su sledeći: 1. U spontanom ili blago stimulisanom ciklusu, najzdraviji folikuli se biraju po principu kvaliteta umesto kvantiteta; 2. Pokazana je značajna korelacija visokih vrednosti estradiola u kasnoj folikularnoj fazi sa većim stopama neonatusa male telesne mase i malih za gestacijsku starost; 3. Vrednosti AMH, LH, testosterona i estradiola su značajno veće u folikulima iz spontanog ciklusa u odnosu na stimulisane folikule, sugerišu i metaboličke promene u folikulima u stimulisanim ciklusima; i 4. Suprafiziološke vrednosti estradiola povećavaju produkciju vezujućeg proteina za

hormon rasta i tako ga neutrališu, posleđi ne smanjuju i nivo insulina sli nog faktora rasta, potrebnog za optimalni sinergizam sa FSH (85).

Nakon što su studije pokazale da su vrednosti AMH i broj antralnih folikula u ranoj folikularnoj fazi u visokoj korelaciji (37,86), broj antralnih folikula i vrednost AMH su dva biomarkera koji se dosledno u nizu studija tokom više godina pokazuju kao najbolji prediktori ovarijalnog odgovora na gonadotropine (87,88). Broj antralnih folikula i vrednost AMH su imali sli an u inak u predikciji broja dobijenih oocita kod IVF pacijenata u ve ini opservacionih kohortnih studija u pojedina nim centrima (37,89–92); me utim, nekoliko studija je pokazalo da je bolji prediktor broj antralnih folikula (93,94) ili vrednost AMH (39,95). Više studija i meta-analiza su ukazale i da oba markera imaju sli nu klini ku vrednost u predikciji i lošeg i prekomernog ovarijalnog odgovora (87,91,96–98). Nasuprot ovim nalazima, tri nedavna velika prospektivna multicentri na ispitivanja IVF pacijenata sa dobrom prognozom su utvrdila da je vrednost AMH bolji prediktor od broja antralnih folikula u stimulisanim ciklusima uz supresiju i GnRH agonistima i GnRH antagonistima (99–101), i za broj dobijenih oocita i za izdvajanje pacijenata u kategorije sa o ekivanim lošim ili prekomernim odgovorom. Dodatno, prema ovim studijama, dodavanje broja antralnih folikula u prediktivne modele nije pove avalo prediktivnu vrednost koju je imao AMH.

Postojanje ovako kontradiktornih podataka, name e potrebu za daljim studijama u ovom pravcu. S obzirom na visoku korelaciju vrednosti AMH i broja antralnih folikula, važno je identifikovati koji od ova dva markera daje bolju predikciju ovarijalne funkcije, kvaliteta oocita i embriona kao i kona nog ishoda IVF postupka i da li je bolje koristiti kombinaciju ova dva markera ili procenu bazirati na osnovu samo jednog od njih(102).

Uopštena superiornost vrednosti AMH nad brojem antralnih folikula u ovim multicentrima ispitivanjima se može objasniti značajnom varijabilnošću u izmeću centara, a zavisna je od onih koji rade ultrasonografski pregled. Ista varijabilnost izmeću u ultrasonografiji može objasniti i razlike u inka broja antralnih folikula kao prediktora u multicentrima i studijama u pojedinačnim centrima. Bilo bi veoma značajno ispitati da li su nalazi multicentričnih ispitivanja određeni integrisanom evaluacijom podataka, ili aktuelnim u inkom svake od studija u pojedinačnim centrima, s obzirom da je vrednost AMH analizirana centralno, a broj antralnih folikula lokalno (100).

Pri tumačenju vrednosti AMH, nedoumice postoje oko stabilnosti AMH eseja, posebno po pitanju optimalnih uslova skladištenja i rukovanja, kao i uloge u interferenciji komplementa koja uzrokuje nestabilnost uzorka. Dok se svi ti faktori detaljno ne ispituju ili automatizovani esej ne bude dostupan, potrebni su internacionalni vodiči i za sve laboratorije kako da skladište uzorke i izvode AMH eseje pod istim uslovima, da uticaj tehnike rukovanja sa posledičnim različitim vrednostima AMH, ne bi menjao kliničku primenu. Dodatno, to bi dalo i mogućnost internacionalnog poređenja rezultata. Do tada, treba biti obazriv u prevođenju cut-off nivoa AMH iz studija u kliničku praksu (103).

Pored toga, opisano je i više faktora koji utiču na apsolutnu koncentraciju AMH, uključujući i gojaznost (104,105), etničku pripadnost (106), vrednost vitamina D u serumu (107,108), polimorfizam AMH i njegovog receptora (109), genetske varijacije izmeću u genoma (110), kao i aktuelno pušenje (111). Klinički značaj ovih opažanja tek treba da bude determinisan.

Ultrasonografsko merenje funkcionalne ovarijalne rezerve može preceniti broj folikula koji će biti senzitivni na stimulaciju gonadotropinima, zbog mogućeg

uključivanja atretičnih folikula u ukupan broj (112). U kliničkoj praksi, merenje antralnih folikula podleže varijabilnosti između ultrasonografskih metoda u pogledu tehnike i metodologije brojanja i merenja folikula (113), što je posebno izraženo na većim klinikama gde se radi timski. Takođe, tehnički aspekti ultrazvučnih aparata (rezolucija, dubina i sl.) kao i različiti aparati (2-D ili 3-D) mogu uticati na interpretaciju merenja broja antralnih folikula (114). Dodatno, ne postoji konsenzus o veličini folikula koji bi se identifikovali kao antralni. Pokazano je da humani antralni folikuli manji od 6 mm proizvode najveći deo koncentracije AMH; ovaj nivo opada sa porastom veličine folikula (115). Uprkos tome, većina studija je saglasna u odabiru folikula kao antralnih folikula baziranom na izmerenom prečniku od 2 do 10 mm (102,116), što je primenjeno i u ovoj studiji.

Pored svega navedenog, čak i kada test ima dobru prediktivnu preciznost, to ne znači da je dovoljno dobar da bi imao kliničku primenu. U proceni kliničke primenljivosti testa, treba uzeti u obzir relativnu težinu kako lažno pozitivne, tako i lažno negativne predikcije. Kada su pacijenti anketirani, ocenili su kao teže pogrešno odustajanje od IVF postupka u odnosu na pogrešno procenjenu stimulaciju tokom IVF postupka. To implicira da danas dostupni testovi ovarijalne rezerve nemaju dovoljnu preciznost za odustajanje od stimulacije ovulacije i IVF postupka (117). Pritom, studijom koja je poredila grupe sa prekomernim, normalnim i lošim ovarijalnim odgovorom, nije dobijena razlika u stopi trudnoća između grupa, što sugeriše da je predikcija lošeg ovarijalnog odgovora i klinički manje značajna od predikcije prekomernog odgovora (118).

Nasuprot većini publikovanih studija, u ispitivanoj populaciji u ovoj studiji, broj antralnih folikula je bio bolji prediktor broja dobijenih oocita od vrednosti AMH, nezavisno od primenjenog protokola stimulacije, a posebno za adekvatan ovarijalni

odgovor, gde je dobijena senzitivnost 84% i specifičnost 85% za cut-off vrednost od >9, u slučaju primene dugog protokola stimulacije uz supresiju sa GnRH agonistima. Dodatno, nijedan parametar nije bio pouzdan u predikciji lošeg ovarijalnog odgovora. Pored toga, uz broj antralnih folikula i vrednost AMH, prediktori ovarijalnog odgovora su bili i godine starosti pacijentkinje i FSH/LH odnos, dok nijedan drugi ispitivani parametar nije bio od značaja u predikciji broja oocita.

Iako je poznato da je morfološko gradiranje embriona slab prediktor kliničkog ishoda, u jednoj studiji je nađena pozitivna veza između vrednosti AMH u serumu posle stimulacije, na dan davanja hCG, i morfologije embriona (40), dok ostale nisu pokazale vezu između bazalnih vrednosti AMH u serumu i kvaliteta embriona (101,119–121). Sugerisano je, zatim, da je koncentracija AMH u folikularnoj tečnosti na dan punkcije folikula i aspiracije oocita, ali ne i koncentracija AMH u serumu, u pozitivnoj korelaciji sa implantacijom embriona i stopama trudnoće (122,123); međutim, kasnija studija je pokazala jaku vezu između koncentracije AMH u serumu i u folikularnoj tečnosti poslednjeg dana stimulacije ovulacije, što pokazuje da nivo AMH u folikularnoj tečnosti zapravo reflektuje nivo cirkulišućeg AMH, odnosno cele kohorte AMH-sekretujućih antralnih folikula, a ne specifičnu AMH produkciju u regrutovanom vodećem folikulu, u kome se AMH ekspresija smatra nemerljivom (115). To implicira da kvalitet embriona nije u direktnoj vezi sa koncentracijom AMH u folikularnoj tečnosti na dan aspiracije oocita (101).

Rezultati ove studije pokazuju da je normalan nivo bazalne vrednosti AMH u serumu značajan prediktor embriona morfološki ocenjenih kao "A" u odnosu na nizak nivo, nezavisno od primenjenog protokola stimulacije, dok visok nivo bazalne vrednosti AMH u serumu nije značajan prediktor embriona klase "A" u odnosu na nizak, nezavisno od primenjenog protokola stimulacije. Ovi nalazi ne odgovaraju nijednoj do

sada publikovanoj studiji, a ne mogu se dovesti u vezu sa ovarijalnim odgovorom, kvalitetom oocita, kao ni krajnjim ishodom – nastankom biohemijske ili kliničke trudnoće u ovoj studiji, pa bi mogli biti smernica za neko buduće istraživanje.

Glavni cilj postupaka asistiranе fertilizacije je nastanak trudnoće koja bi rezultovala u rađanju živog deteta. Velika meta-analiza koja je obuhvatila 28 studija utvrdila je da su godine starosti najbolji prediktor nastanka trudnoće (124); dodatno, nalazi ove studije su pokazali da dodavanje vrednosti AMH i broja antralnih folikula nije promenilo prediktivnu moć godina starosti. Odsustvo značajne povezanosti vrednosti AMH u serumu i stope trudnoća je potvrđeno u više studija (37,39,99,101,119). Bilo je i pokušaja da se nađe cut-off vrednost AMH u serumu koja bi izdvojila pacijente kod kojih je došlo do trudnoće od onih kod kojih nije došlo do trudnoće, ali i to je bilo bez uspeha (97). U samo nekoliko studija je navedeno da je vrednost AMH prediktor trudnoće posle postupka asistiranе fertilizacije, ali su limitirane malim brojem ispitanika ili retrospektivnim opservacionim dizajnom (90,92). Njihovi nalazi se, bar delimično, mogu objasniti većim brojem oocita i nastalih embriona dostupnih za dalji IVF postupak kod pacijentkinja sa visokim vrednostima AMH u odnosu na pacijentkinje sa niskim vrednostima ovog hormona. U svakom slučaju, nijedna cut-off vrednost nije dala zadovoljavajuću kombinaciju senzitivnosti, specifičnosti i prediktivne moći za nastanak trudnoće (125).

Rezultati ove studije odgovaraju prethodno publikovanim nalazima. Značajni prediktori nastajanja biohemijskih i kliničkih trudnoća bili su godine starosti, vrednosti AMH i FSH i broj antralnih folikula, i to samo kod pacijentkinja kod kojih je primenjen kratak protokol stimulacije sa GnRH agonistima. Za AMH, određena je cut-off vrednost od >2 za biohemijske trudnoće, za koju je senzitivnost bila 57% i specifičnost 65%. Za broj antralnih folikula određena je cut-off vrednost od >11 za

kliničke trudnoće, za koju je senzitivnost bila 68% i specifičnost 61%, što je svakako nedovoljna prediktivna moć.

Studije koje su u analizu uključivale živorođenost kao krajnji ishod, dale su nalaze da su godine starosti i vrednost AMH nezavisne varijable u predikciji živorođenosti posle IVF postupaka (126,127); dodatno, jedna studija je pokazala iste varijable kao prediktore živorođenosti kod žena preko 35 godina, dok je kod žena mlađih od 35 godina broj kvalitetnih embriona bio jedini prediktor živorođenosti (128).

Ovakva nekoherentnost nalaza je svakako posledica činjenice da postoje brojni drugi faktori, kao što su kvalitet embriona, tehnika embriotransfera, endometrijalna receptivnost, koji utiču na šanse za postizanje trudnoće više od ovarijalne rezerve i posledičnog broja dobijenih oocita (129); to je verovatno razlog zbog koga testovi ovarijalne rezerve nisu dovoljno senzitivni u predikciji ishoda trudnoće posle IVF postupaka. U jednoj od studija, dobijen je i podatak da je čak 17% od živorođene dece u ispitivanoj populaciji, bilo kod pacijentkinja kod kojih su vrednosti AMH bile ispod cut-off vrednosti determinisanih u predikciji lošeg ovarijalnog odgovora (130). Iz tog razloga, vrednost AMH, kao i druge markere ovarijalne rezerve, ne treba koristiti za isključivanje parova iz postupaka asistiranе fertilizacije.

ZAKLJUČAK

Studijom je pokazano da je na osnovu testova ovarijalne rezerve moguće predvideti ishod asistiranе fertilizacije. Vrednost AMH i broj antralnih folikula su veoma pouzdani prediktori i adekvatnog i prekomernog ovarijalnog odgovora, nezavisno od primenjenog protokola stimulacije. Takođe, od značaja su i u predikciji kvaliteta embriona, kao i nastanka biohemijskih i kliničkih trudnoća.

Individualizaciju protokola stimulacije, smanjenje stope komplikacija i veći procenat uspešnosti postupaka asistiranе fertilizacije je moguće ostvariti pristupom zasnovanim na vrednostima AMH u serumu i broju antralnih folikula. Međutim, ove i druge markere ovarijalne rezerve, ne treba koristiti za isključivanje parova iz postupaka asistiranе fertilizacije zbog nedovoljne prediktivne moći i za krajnji cilj ovih postupaka – nastanak trudnoće i rađanje živog deteta.

LITERATURA

1. Block E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages. *Acta Anat* 1952;14:108–23.
2. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006;12:685–718.
3. ACOG. Committee opinion no. 618: Ovarian reserve testing. *Obstet Gynecol* 2015;125:268–73.
4. Pelosi E, Forabosco A, Schlessinger D. Genetics of the ovarian reserve. *Front Genet* 2015;6:308.
5. Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, et al. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? *Biol Reprod* 2014;90:85.
6. Findlay JK, Hutt KJ, Hickey M, Anderson RA. What is the “ovarian reserve”? *Fertil Steril* 2015;103:628–30.
7. Nikolaou D, Templeton A. Early ovarian ageing: a hypothesis. Detection and clinical relevance. *Hum Reprod* 2003;18:1137–9.
8. Faddy MJ, Gosden RG. A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary. *Hum Reprod* 1995;10:770–5.
9. van Noord PA, Dubas JS, Dorland M, Boersma H, te Velde E. Age at natural menopause in a population-based screening cohort: the role of menarche, fecundity, and lifestyle factors. *Fertil Steril* 1997;68:95–102.
10. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting

- menopause. *Hum Reprod* 1992;7:1342–6.
11. Sun W, Stegmann BJ, Henne M, Catherino WH, Segars JH. A new approach to ovarian reserve testing. *Fertil Steril* 2008;90:2196–202.
 12. Fasouliotis SJ, Simon A, Laufer N. Evaluation and treatment of low responders in assisted reproductive technology: a challenge to meet. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:357–73.
 13. Sills ES, Alper MM, Walsh APH. Ovarian reserve screening in infertility: practical applications and theoretical directions for research. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;146:30–6.
 14. Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2003;9:61–76.
 15. Watt AH, Legedza AT, Ginsburg ES, Barbieri RL, Clarke RN, Hornstein MD. The prognostic value of age and follicle-stimulating hormone levels in women over forty years of age undergoing in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:264–8.
 16. Ashrafi M, Madani T, Tehranian AS, Malekzadeh F. Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Int J Gynaecol Obstet* 2005;91:53–7.
 17. van Montfrans JM, Hoek A, van Hooff MH, de Koning CH, Tonch N, Lambalk CB. Predictive value of basal follicle-stimulating hormone concentrations in a general subfertility population. *Fertil Steril* 2000;74:97–103.
 18. Letterie GS, Lee JS, Padmanabhan V. Assessment of ovarian reserve by using the follicle-stimulating hormone isoform distribution pattern to predict the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;86:1547–9.

19. van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Broekmans FJ, et al. Predictive value and clinical impact of Basal follicle-stimulating hormone in subfertile, ovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2163–8.
20. Luna M, Grunfeld L, Mukherjee T, Sandler B, Copperman AB. Moderately elevated levels of basal follicle-stimulating hormone in young patients predict low ovarian response, but should not be used to disqualify patients from attempting in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007;87:782–7.
21. de Koning CH, Popp-Snijders C, Schoemaker J, Lambalk CB. Elevated FSH concentrations in imminent ovarian failure are associated with higher FSH and LH pulse amplitude and response to GnRH. *Hum Reprod* 2000;15:1452–6.
22. Coccia ME, Rizzello F. Ovarian reserve. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1127:27–30.
23. Mukherjee T, Copperman AB, Lapinski R, Sandler B, Bustillo M, Grunfeld L. An elevated day three follicle-stimulating hormone:luteinizing hormone ratio (FSH:LH) in the presence of a normal day 3 FSH predicts a poor response to controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1996;65:588–93.
24. Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995;64:991–4.
25. Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1995;64:1136–40.
26. Roberts JE, Spandorfer S, Fasouliotis SJ, Kashyap S, Rosenwaks Z. Taking a basal follicle-stimulating hormone history is essential before initiating in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2005;83:37–41.

27. Lee SJ, Lenton EA, Sexton L, Cooke ID. The effect of age on the cyclical patterns of plasma LH, FSH, oestradiol and progesterone in women with regular menstrual cycles. *Hum Reprod* 1988;3:851–5.
28. Hofmann GE, Scott RT, Horowitz GM, Thie J, Navot D. Evaluation of the reproductive performance of women with elevated day 10 progesterone levels during ovarian reserve screening. *Fertil Steril* 1995;63:979–83.
29. Younis JS, Matilsky M, Radin O, Ben-Ami M. Increased progesterone/estradiol ratio in the late follicular phase could be related to low ovarian reserve in in vitro fertilization-embryo transfer cycles with a long gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril* 2001;76:294–9.
30. Gruber I, Just A, Birner M, Lösch A. Serum estradiol/progesterone ratio on day of embryo transfer may predict reproductive outcome following controlled ovarian hyperstimulation and in vitro fertilization. *J Exp Clin Assist Reprod* 2007;4:1.
31. Steckler T, Wang J, Bartol FF, Roy SK, Padmanabhan V. Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment. *Endocrinology* 2005;146:3185–93.
32. Shifren JL, Schiff I. The aging ovary. *J Womens Health Gend Based Med* 2000 Jan;9:3–7.
33. Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME. Serum müllerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2000;73:859–61.
34. de Vet A, Laven JSE, de Jong FH, Themmen APN, Fauser BCJM. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002;77:357–62.

35. La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, et al. Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2007;22:766–71.
36. Fanchin R, Taieb J, Lozano DHM, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod* 2005;20:923–7.
37. van Rooij IAJ, Broekmans FJM, te Velde ER, Fauser BCJM, Bancsi LFJMM, de Jong FH, et al. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002 Dec;17:3065–71.
38. Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M. Inhibin B and anti-Müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG* 2004;111:1248–53.
39. Fiçicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2006;85:592–6.
40. Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, et al. Müllerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. *Hum Reprod* 2006;21:159–63.
41. Soules MR, Battaglia DE, Klein NA. Inhibin and reproductive aging in women. *Maturitas* 1998;30:193–204.
42. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, et al. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1401–5.

43. Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, McNeilly AS, Battaglia DE, Soules MR. Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2742–5.
44. Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 1997;67:110–4.
45. Corson SL, Gutmann J, Batzer FR, Wallace H, Klein N, Soules MR. Inhibin-B as a test of ovarian reserve for infertile women. *Hum Reprod* 1999;14:2818–21.
46. Fowler PA, Fahy U, Culler MD, Knight PG, Wardle PG, McLaughlin EA, et al. Gonadotrophin surge-attenuating factor bioactivity is present in follicular fluid from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1995;10:68–74.
47. Coppola F, Ferrari B, Barusi L, Caccavari V, Salvarani MC, Piantelli G. Follicular fluid levels of vascular endothelial growth factor and early corpus luteum function during assisted reproductive technology cycles. *J Exp Clin Assist Reprod* 2005;2:13.
48. Ocal P, Aydin S, Cepni I, Idil S, Idil M, Uzun H, et al. Follicular fluid concentrations of vascular endothelial growth factor, inhibin A and inhibin B in IVF cycles: are they markers for ovarian response and pregnancy outcome? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;115:194–9.
49. Fried G, Remaeus K, Harlin J, Krog E, Csemiczky G, Aanesen A, et al. Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-I/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2003;20:167–76.

50. Stadtmauer L, Vidali A, Lindheim SR, Sauer M V. Follicular fluid insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 and -3 vary as a function of ovarian reserve and ovarian stimulation. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:587–93.
51. Navot D, Rosenwaks Z, Margalioth EJ. Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet (London, England)* 1987;2:645–7.
52. Scott RT, Leonardi MR, Hofmann GE, Illions EH, Neal GS, Navot D. A prospective evaluation of clomiphene citrate challenge test screening of the general infertility population. *Obstet Gynecol* 1993;82:539–44.
53. Hannoun A, Abu Musa A, Awwad J, Kaspar H, Khalil A. Clomiphene citrate challenge test: cycle to cycle variability of cycle day 10 follicle stimulating hormone level. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1998;25:155–6.
54. Jain T, Soules MR, Collins JA. Comparison of basal follicle-stimulating hormone versus the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril* 2004;82:180–5.
55. Garcia JE. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues: applications in gynecology. *Clin Obstet Gynecol* 1993;36:719–26.
56. Moretti C, Toscano V. Dynamic evaluation of ovarian reserve and abnormal androgen excess in women. *J Endocrinol Invest* 2003;26:114–23.
57. Fanchin R, de Ziegler D, Olivennes F, Taieb J, Dzik A, Frydman R. Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable screening test for detecting “poor responders” in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1994;9:1607–11.
58. Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT, Soong YK, Hsu KH. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies.

- Fertil Steril 1998;69:505–10.
59. Chang MY, Chiang CH, Chiu TH, Hsieh TT, Soong YK. The antral follicle count predicts the outcome of pregnancy in a controlled ovarian hyperstimulation/intrauterine insemination program. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:12–7.
 60. Bancsi LFJMM, Broekmans FJM, Eijkemans MJC, de Jong FH, Habbema JDF, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002;77:328–36.
 61. Hendriks DJ, Mol B-WJ, Bancsi LFJMM, Te Velde ER, Broekmans FJM. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril* 2005;83:291–301.
 62. Avril C. Antral follicle count and oocyte quality. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2006;35:242–243.
 63. Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D, Vujisic S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril* 2003;79:190–7.
 64. Syrop CH, Dawson JD, Husman KJ, Sparks AE, Van Voorhis BJ. Ovarian volume may predict assisted reproductive outcomes better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. *Hum Reprod* 1999;14:1752–6.
 65. Chui DK, Pugh ND, Walker SM, Gregory L, Shaw RW. Follicular vascularity—the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in vitro fertilization programme: a preliminary study. *Hum Reprod* 1997;12:191–6.

66. Costello MF, Shrestha SM, Sjoblom P, McNally G, Bennett MJ, Steigrad SJ, et al. Power doppler ultrasound assessment of the relationship between age and ovarian perifollicular blood flow in women undergoing in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:359–65.
67. Shrestha SM, Costello MF, Sjoblom P, McNally G, Bennett M, Steigrad SJ, et al. Power Doppler ultrasound assessment of follicular vascularity in the early follicular phase and its relationship with outcome of in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:161–9.
68. Robson SJ, Barry M, Norman RJ. Power Doppler assessment of follicle vascularity at the time of oocyte retrieval in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2008;90:2179–82.
69. Kim SH, Ku SY, Jee BC, Suh CS, Moon SY, Lee JY. Clinical significance of transvaginal color Doppler ultrasonography of the ovarian artery as a predictor of ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 2002;19:103–12.
70. Verhagen TEM, Hendriks DJ, Bancsi LFJMM, Mol BWJ, Broekmans FJM. The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2008;14:95–100.
71. de Carvalho BR, Rosa e Silva ACJ de S, Rosa e Silva JC, dos Reis RM, Ferriani RA, Silva de Sá MF. Ovarian reserve evaluation: state of the art. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:311–22.
72. Oehninger S. Poor responders in in vitro fertilization (IVF) therapy: the challenge continues. *Facts, views Vis ObGyn* 2011;3:101–8.
73. Oudendijk JF, Yarde F, Eijkemans MJC, Broekmans FJM, Broer SL. The poor

- responder in IVF: is the prognosis always poor?: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;18:1–11.
74. Shrestha D, La X, Feng HL. Comparison of different stimulation protocols used in in vitro fertilization: a review. *Ann Transl Med* 2015;3:137.
 75. Kim C-H, You R-M, Kang H-J, Ahn J-W, Jeon I, Lee J-W, et al. GnRH antagonist multiple dose protocol with oral contraceptive pill pretreatment in poor responders undergoing IVF/ICSI. *Clin Exp Reprod Med* 2011;38:228–33.
 76. A double-blind, randomized, dose-finding study to assess the efficacy of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle. *Hum Reprod* 1998;13:3023–31.
 77. Malmusi S, La Marca A, Giulini S, Xella S, Tagliasacchi D, Marsella T, et al. Comparison of a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist and GnRH agonist flare-up regimen in poor responders undergoing ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2005;84:402–6.
 78. Xiao J, Chang S, Chen S. The effectiveness of gonadotropin-releasing hormone antagonist in poor ovarian responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2013;100:1594–601.
 79. Franco JG, Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Felipe V, Cornicelli J, et al. GnRH agonist versus GnRH antagonist in poor ovarian responders: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2006;13:618–27.
 80. Marci R, Caserta D, Dolo V, Tatone C, Pavan A, Moscarini M. GnRH antagonist in IVF poor-responder patients: results of a randomized trial. *Reprod Biomed Online* 2005;11:189–93.
 81. Marci R, Caserta D, Lisi F, Graziano A, Soave I, Lo Monte G, et al. In vitro

- fertilization stimulation protocol for normal responder patients. *Gynecol Endocrinol* 2013;29:109–12.
82. Al-Inany HG, Youssef MAFM, Aboulghar M, Broekmans F, Sterrenburg M, Smit J, et al. GnRH antagonists are safer than agonists: an update of a Cochrane review. *Hum Reprod Update* 2011;17:435.
 83. Lainas TG, Sfontouris IA, Zorzovilis IZ, Petsas GK, Lainas GT, Alexopoulou E, et al. Flexible GnRH antagonist protocol versus GnRH agonist long protocol in patients with polycystic ovary syndrome treated for IVF: a prospective randomised controlled trial (RCT). *Hum Reprod* 2010;25:683–9.
 84. Knez J, Kovač B, Medved M, Vlasić V. What is the value of anti-Müllerian hormone in predicting the response to ovarian stimulation with GnRH agonist and antagonist protocols? *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13:58.
 85. Blumenfeld Z. Why more is less and less is more when it comes to ovarian stimulation. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:1713–9.
 86. Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003;18:323–7.
 87. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artenisio AC, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 2010;16:113–30.
 88. Nelson SM. Biomarkers of ovarian response: current and future applications. *Fertil Steril* 2013;99:963–9.
 89. Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-müllerian hormone and inhibin B: predictors of

- ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG* 2005;112:1384–90.
90. Lekamge DN, Barry M, Kolo M, Lane M, Gilchrist RB, Tremellen KP. Anti-Müllerian hormone as a predictor of IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2007;14:602–10.
 91. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. A prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2010;93:855–64.
 92. Elgindy EA, El-Haieg DO, El-Sebaey A. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril* 2008;89:1670–6.
 93. Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, et al. Dynamic assays of inhibin B, anti-Müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod* 2005;20:3178–83.
 94. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Themmen A, de Jong F, Lambalk C. Evaluation of anti-Müllerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2008;90:737–43.
 95. McIlveen M, Skull JD, Ledger WL. Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Hum Reprod* 2007;22:778–85.
 96. Broer SL, Mol BWJ, Hendriks D, Broekmans FJM. The role of antimüllerian

- hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril* 2009;91:705–14.
97. Broer SL, Mol B, Dólleman M, Fauser BC, Broekmans FJM. The role of anti-Müllerian hormone assessment in assisted reproductive technology outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010;22:193–201.
 98. Broer SL, Dólleman M, Opmeer BC, Fauser BC, Mol BW, Broekmans FJM. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011;17:46–54.
 99. Arce J-C, La Marca A, Mirner Klein B, Nyboe Andersen A, Fleming R. Antimüllerian hormone in gonadotropin releasing-hormone antagonist cycles: prediction of ovarian response and cumulative treatment outcome in good-prognosis patients. *Fertil Steril* 2013;99:1644–53.
 100. Nelson SM, Klein BM, Arce J-C. Comparison of antimüllerian hormone levels and antral follicle count as predictor of ovarian response to controlled ovarian stimulation in good-prognosis patients at individual fertility clinics in two multicenter trials. *Fertil Steril* 2015;103:923–30.
 101. Anckaert E, Smitz J, Schiettecatte J, Klein BM, Arce J-C. The value of anti-Müllerian hormone measurement in the long GnRH agonist protocol: association with ovarian response and gonadotrophin-dose adjustments. *Hum Reprod* 2012;27:1829–39.
 102. Barbakadze L, Kristesashvili J, Khonelidze N, Tsagareishvili G. The correlations of anti-müllerian hormone, follicle-stimulating hormone and antral follicle count in different age groups of infertile women. *Int J Fertil Steril* 2015;8:393–8.
 103. Schipper I, Visser JA, Themmen AP, Laven JSE. Limitations and pitfalls of

- antimüllerian hormone measurements. *Fertil Steril* 2012;98:823–4.
104. Freeman EW, Gracia CR, Sammel MD, Lin H, Lim LC-L, Strauss JF. Association of anti-mullerian hormone levels with obesity in late reproductive-age women. *Fertil Steril* 2007;87:101–6.
 105. Buyuk E, Seifer DB, Illions E, Grazi R V, Lieman H. Elevated body mass index is associated with lower serum anti-mullerian hormone levels in infertile women with diminished ovarian reserve but not with normal ovarian reserve. *Fertil Steril* 2011;95:2364–8.
 106. Seifer DB, Golub ET, Lambert-Messerlian G, Benning L, Anastos K, Watts DH, et al. Variations in serum müllerian inhibiting substance between white, black, and Hispanic women. *Fertil Steril* 2009;92:1674–8.
 107. Dennis NA, Houghton LA, Jones GT, van Rij AM, Morgan K, McLennan IS. The level of serum anti-Müllerian hormone correlates with vitamin D status in men and women but not in boys. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2450–5.
 108. Merhi ZO, Seifer DB, Weedon J, Adeyemi O, Holman S, Anastos K, et al. Circulating vitamin D correlates with serum antimüllerian hormone levels in late-reproductive-aged women: Women’s Interagency HIV Study. *Fertil Steril* 2012;98:228–34.
 109. Kevenaar ME, Themmen APN, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Laven JSE, van Schoor NM, et al. A polymorphism in the AMH type II receptor gene is associated with age at menopause in interaction with parity. *Hum Reprod* 2007;22:2382–8.
 110. Schuh-Huerta SM, Johnson NA, Rosen MP, Sternfeld B, Cedars MI, Reijo Pera RA. Genetic variants and environmental factors associated with hormonal markers of ovarian reserve in Caucasian and African American women. *Hum*

- Reprod 2012;27:594–608.
111. Dólleman M, Verschuren WMM, Eijkemans MJC, Dollé MET, Jansen EHJM, Broekmans FJM, et al. Reproductive and lifestyle determinants of anti-Müllerian hormone in a large population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:2106–15.
 112. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986;1:81–7.
 113. Deb S, Jayaprakasan K, Campbell BK, Clewes JS, Johnson IR, Raine-Fenning NJ. Intraobserver and interobserver reliability of automated antral follicle counts made using three-dimensional ultrasound and SonoAVC. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33:477–83.
 114. Deb S, Campbell BK, Clewes JS, Raine-Fenning NJ. Quantitative analysis of antral follicle number and size: a comparison of two-dimensional and automated three-dimensional ultrasound techniques. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010;35:354–60.
 115. Weenen C, Laven JSE, Von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10:77–83.
 116. Jayaprakasan K, Deb S, Batcha M, Hopkisson J, Johnson I, Campbell B, et al. The cohort of antral follicles measuring 2-6 mm reflects the quantitative status of ovarian reserve as assessed by serum levels of anti-Müllerian hormone and response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2010;94:1775–81.
 117. Mol BW, Verhagen TEM, Hendriks DJ, Collins JA, Coomarasamy A, Opmeer BC, et al. Value of ovarian reserve testing before IVF: a clinical decision

- analysis. *Hum Reprod* 2006;21:1816–23.
118. Hamdine O, Eijkemans MJC, Lentjes EWG, Torrance HL, Macklon NS, Fauser BCJM, et al. Ovarian response prediction in GnRH antagonist treatment for IVF using anti-Müllerian hormone. *Hum Reprod* 2015;30:170–8.
 119. Smeenk MJ, Sweep FCGJ, Zielhuis GA, Kremer JAM, Thomas CMG, Braat DDM. Antimüllerian hormone predicts ovarian responsiveness, but not embryo quality or pregnancy, after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2007;87:223–6.
 120. Lie Fong S, Baart EB, Martini E, Schipper I, Visser JA, Themmen APN, et al. Anti-Müllerian hormone: a marker for oocyte quantity, oocyte quality and embryo quality? *Reprod Biomed Online* 2008;16:664–70.
 121. Aydın GA, Yavuz A, Terzi H, Kutlu T. Assessment of the relationship of basal serum anti-mullerian hormone levels with oocyte quality and pregnancy outcomes in patients undergoing ICSI. *Iran J Reprod Med* 2015;13:231–6.
 122. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, et al. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1796–802.
 123. Kim JH, Lee JR, Chang HJ, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Anti-Müllerian hormone levels in the follicular fluid of the preovulatory follicle: a predictor for oocyte fertilization and quality of embryo. *J Korean Med Sci* 2014;29:1266–70.
 124. Broer SL, van Disseldorp J, Broeze KA, Dolleman M, Opmeer BC, Bossuyt P, et al. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the

- prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. *Hum Reprod Update* 2013;19:26–36.
125. Rezende CP, Rocha AL, Dela Cruz C, Borges LE, Del Puerto HL, Reis FM. Serum antimüllerian hormone measurements with second generation assay at two distinct menstrual cycle phases for prediction of cycle cancellation, pregnancy and live birth after in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2014;31:1303–10.
 126. La Marca A, Nelson SM, Sighinolfi G, Manno M, Baraldi E, Roli L, et al. Anti-Müllerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2011;22:341–9.
 127. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Anti-Müllerian hormone (AMH) defines, independent of age, low versus good live-birth chances in women with severely diminished ovarian reserve. *Fertil Steril* 2010;94:2824–7.
 128. Lee T-H, Liu C-H, Huang C-C, Hsieh K-C, Lin P-M, Lee M-S. Impact of female age and male infertility on ovarian reserve markers to predict outcome of assisted reproduction technology cycles. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:100.
 129. Boomsma CM, Macklon NS. What can the clinician do to improve implantation? *Reprod Biomed Online* 2007;14:27–37.
 130. Mutlu MF, Erdem M, Erdem A, Yildiz S, Mutlu I, Arisoy O, et al. Antral follicle count determines poor ovarian response better than anti-Müllerian hormone but age is the only predictor for live birth in in vitro fertilization cycles. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:657–65.

BIOGRAFIJA

Rođena 22. septembra 1976. godine u Beogradu.

Osnovnu školu i gimnaziju završila u Beogradu.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala školske 1995/96. godine.

Završila studije na Medicinskom fakultetu dana 29.06.2001. godine sa opštim uspehom 9.86 u toku studija.

Dobila nagradu Zadužbine Nikole Spasića za najboljeg diplomiranog studenta Medicinskog fakulteta u Beogradu za školsku 2000/2001. godinu.

Zaposlena na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije od 31.12.2002. godine.

Prvu godinu specijalističkih studija na Medicinskom fakultetu upisala školske 2002/03. godine.

Specijalistički ispit iz ginekologije i akušerstva položila 29.09.2006. godine sa ocenom odličan.

Izabrana u zvanje kliničkog asistenta školske 2011/12. godine.

Magistarsku tezu pod nazivom „Procena efekata lečenja insulinske rezistencije na ishod asistirane reprodukcije“ sa mentorom Prof dr Nebojšom Lalićem i komentorom Prof dr Aleksandrom Ljubićem, odbranila dana 24.12.2007. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Vede naučnih oblasti medicinskih nauka na XXVI sednici održanoj 01. jula 2010. godine odobrilo je izradu doktorske disertacije sa temom „Predviđanje ishoda asistirane fertilizacije na osnovu testova ovarijalne rezerve“.

Autor i koautor većeg broja radova na domaćim i inostranim kongresima i u domaćim i inostranim časopisima.

Aktivno se služi engleskim, francuskim i italijanskim jezikom.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a _____ Dr Jelena Micić

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Predviđanje ishoda asistirane fertilizacije na osnovu testova ovarijalne rezerve

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 04.05.2016.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Dr Jelena Micić

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada Predviđanje ishoda asistirane fertilizacije na osnovu testova
ovarijalne rezerve

Mentor Akademik Prof.dr Neboša Radunović

Potpisani Dr Jelena Micić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 04.05.2016.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Predviđanje ishoda asistirane fertilizacije na osnovu testova ovarijalne rezerve

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 04.05.2016.



5

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.