



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Milan S. Trenkić

**UTICAJ PROTOKOLA STIMULACIJE
KOD POLICISTIČNOG OVARIJALNOG SINDROMA
NA ISHOD VANTELESNOG OPLOĐENJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2016.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Milan S. Trenkić

**THE EFFECT OF STIMULATION PROTOCOL
IN POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME
ON THE OUTCOME OF IN VITRO FERTILIZATION**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2016.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: Prof. dr Jasmina Popović
Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Naslov: Uticaj protokola stimulacije kod policističnog ovarijalnog sindroma na ishod vantelesnog oplođenja

Rezime: Policistični ovarijalni sindrom (PCOS) se smatra najčešćim endokrinološkim poremećajem žena u reproduktivnom dobu. Karakteriše se hroničnom anovulacijom, znacima hiperandrogenizma, policističnim izgledom jajnika i subfertilitetom ili sterilitetom. Iako su policistični jajnici čest nalaz u žena sa infertilitetom, tačna incidenca ovih pacijentkinja uključenih u program vantelesnog oplođenja nije poznata.

Cilj istraživanja je proceniti uticaj PCOS-a na tok i ishod vantelesnog oplođenja. Porediti karakteristike ovarijalnog odgovora i uporediti stope kliničkih trudnoća i pobačaja kod žena sa PCOS-om i žena sa tubarnim uzrokom steriliteta. Ispitati koji protokol ovarijalne stimulacije kod pacijentkinja sa PCOS-om ima veći uspeh a manji rizik od nastanka ovarijalnog hiperstimulacijskog sindroma (OHSS). Ispitati kakav uticaj imaju godine života, indeks telesne mase, vrednosti anti-Millerovog hormona i upotreba metformina na ishod vantelesnog oplođenja kod pacijentkinja sa PCOS-om.

Istraživanje je organizovano kao prospektivna komparativna studija. Studijom su bile obuhvaćene 123 pacijentkinje sa PCOS-om i 94 pacijentkinje koje su u program vantelesnog oplođenja bile uključene zbog tubarnog uzroka infertiliteta. Pacijentkinje su bile tretirane dugim protokolom GnRH agonistima, kratkim protokolom GnRH agonistima ili fleksibilnim protokolom antagonistima GnRH.

Pacijentkinje sa PCOS-om imaju veći broj dobijenih oocita uz nižu stopu fertilizacije. Stope kliničkih trudnoća i pobačaja nisu se razlikovale između grupa, dok je OHSS bio prisutan samo kod pacijentkinja sa PCOS-om. Vreme stimulacije pacijentkinja sa PCOS-om bilo je kraće u grupi sa antagonistima dok je ukupan broj aspiriranih oocita bio značajno veći u grupi sa agonistima. Statistički značajno veći broj dobijenih embriona kao i embriona najboljeg kvaliteta u grupi agonista nije uticao na stopu kliničkih trudnoća.

Zaključili smo da pacijentkinje sa PCOS-om postižu slične stope kliničkih trudnoća kao žene sa tubarnim uzrokom infertiliteta. Protokol sa antagonistima daje slične stope kliničkih trudnoća kao protokol sa agonistima. Iako ne postoji statistički značajna razlika u incidenci OHSS-a, primećena je ipak ređa pojava ove ozbiljne komplikacije u protokulu sa antagonistima.

Naučna oblast: Medicina
Naučna disciplina: Ginekologija i akušerstvo

Ključne reči:

Policistični ovarijalni sindrom, GnRH agonisti, GnRH antagonisti, vantelesno oplodjenje, kvalitet embriona

UDK:

615.256:618.177-089.888.11(043.3)

CERIF
klasifikacija:

B 570 Акушерство, гинекологија, андрологија, репродукција,
ПОЛНОСТ

Tip licence
Kreativne
zajednice:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Jasmina Popović, MD, PhD Faculty of Medicine, University of Nis
Title:	The effect of stimulation protocol in polycystic ovarian syndrome on the outcome of in vitro fertilization
Abstract:	<p>Polycystic ovarian syndrome (PCOS) is considered one of the most common endocrine disorders of women of reproductive age. It is characterized by chronic anovulation, signs of hyperandrogenism, polycystic appearance of ovaries and subfertility or sterility. Although polycystic ovaries are a common finding in infertile women, the exact incidence of these patients included in the in vitro fertilization program is not known.</p> <p>The aim of this study was to assess the effect of PCOS on the course and the outcome of in vitro fertilization; compare the characteristics of ovarian response and compare the clinical pregnancy and miscarriage rates in women with PCOS to those in women with tubal factor sterility; examine which ovarian stimulation protocol in patients with PCOS has a higher success rate and a lower risk of the occurrence of Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS); examine the effect of age, body mass index, levels of Anti-Mullerian hormone and the use of metformin on in vitro fertilization (IVF) outcomes in patients with PCOS.</p> <p>The research was conducted as a prospective comparative study. The study included 123 patients with PCOS and 94 patients participating IVF program due to tubal sterility. The patients were treated by a long GnRH agonist protocol, a short GnRH agonist protocol or a flexible GnRH antagonist protocol.</p> <p>The patients with PCOS have a higher number of the oocytes retrieved and a lower fertilization rate. Clinical pregnancy and miscarriage rates did not differ significantly between the two groups, while OHSS was present only in the group of patients with PCOS. The length of stimulation of patients with PCOS was shorter in the antagonist group, whereas the total number of aspirated oocytes was statistically significantly higher in the agonist group. Significantly higher number of the obtained embryos as well as a higher number of best quality embryos in the agonist group did not affect the clinical pregnancy rate.</p> <p>We have concluded that patients with PCOS achieve clinical pregnancy rates similar to those of women with tubal factor infertility. The antagonist protocol has clinical pregnancy rate comparable to that of the agonist protocol. Although there is no statistically significant difference in the incidence of OHSS, a less frequent occurrence of this serious complication has been noticed in the antagonist protocol.</p>
Scientific Field:	Medicine
Scientific Discipline:	Gynecology and obstetrics

Key Words: Polycystic ovary syndrome, GnRH agonists, GnRH antagonists, in vitro fertilization, embryo quality

UDC: 615.256:618.177-089.888.11(043.3)

CERIF
Classification: B570 Obstetrics, gynecology, andrology, reproduction, sexuality

Creative Commons License Type: **CC BY-NC-ND**

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Definicija policističnog ovarijalnog sindroma (PCOS-a)	3
2.2. Dijagnostički kriterijumi PCOS-a	3
2.2.1. NIH kriterijum	3
2.2.2. Rotterdamski kriterijum.....	4
2.2.3. AES kriterijum	5
2.3. Prevalenca i incidenca PCOS-a.....	7
2.4. Dijagnoza i klinička slika PCOS-a.....	8
2.4.1. Oligo-anovulacija	8
2.4.2. Klinički hiperandrogenizam i/ili biohemijska hiperandrogenemija	9
2.4.3. Ultrazvučni nalaz policističnih jajnika	11
2.4.4. Isključenje bolesti koje se slično manifestuju	12
2.5. Etiologija sindroma policističnih jajnika.....	12
2.6. Patofiziologija sindroma policističnih jajnika.....	14
2.6.1. Poremećena folikulogeneza	14
2.6.2. Neuroendokrinološki poremećaji	17
2.6.3. Uticaj insulina i insulinske rezistencije	18
2.6.4. Gojaznost i uloga adipokina	20
2.7. Posledice i rizici PCOS-a	22
2.8. Lečenje PCOS-a	23
2.8.1. Antiestrogen (Klomifen citrat)	24
2.8.2. Inhibitori aromataze (Letrozol)	25
2.8.3. Oralni antidijabetici (Metformin)	26
2.8.4. Gonadotropini.....	27
2.8.5. Laparoskopska elektrokoagulacija strome jajnika (ovarijalni drilling).....	28
2.8.6. Vantelesno oplođenje (VTO)	29
2.9. Ovarijalni hiperstimulacioni sindrom (OHSS).....	30
2.9.1. Klasifikacija OHSS-a	31
2.9.2. Prevencija OHSS-a.....	33
2.9.3. Lečenje pacijentkinja sa OHSS-om.....	36
2.10. VTO tretman i primena kod pacijentkinja sa PCOS-om.....	38
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	43

4.	ISPITANICE I METODE ISTRAŽIVANJA.....	44
4.1.	Karakteristike studijske grupe	44
4.2.	Karakteristike kontrolne grupe	44
4.3.	Metode pregleda	45
4.4.	Uključujući i isključujući kriterijumi	45
4.5.	Parametri koji su praćeni tokom istraživanja	46
4.6.	Dobijanje i priprema jajne ćelije	47
4.7.	Dobijanje i priprema semena.....	48
4.8.	IVF procedura, evaluacija fertilizacije i razvoja embriona	49
4.9.	Embriotransfer.....	50
4.10.	Gradacija OHSS-a	50
4.11.	Statistička obrada i prezentacija podataka	50
5.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	52
5.1.	Uticaja PCOS-a na tok i ishod VTO-a	52
5.1.1.	Distribucija ispitanica po godinama starosti, BMI-u i hormonskom statusu	52
5.1.2.	Karakteristike ovarijalnog odgovora	55
5.1.3.	Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije	57
5.1.4.	Kvalitet embriona	57
5.1.5.	Uspeh VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS–om	59
5.2.	Uticaja protokola stimulacije na tok i ishod VTO-a.....	60
5.2.1.	Distribucija ispitanica po godinama starosti, BMI-u i hormonskom statusu	60
5.2.2.	Karakteristike ovarijalnog odgovora	61
5.2.3.	Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije	62
5.2.4.	Kvalitet embriona	63
5.2.5.	Uspeh VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od primenjenog protokola stimulacije	66
5.3.	Uticaj upotrebe metformina na tok i ishod VTO-a kod pacijentkinja ca PCOS-om	67
5.3.1.	Karakteristike ovarijalnog odgovora	67
5.3.2.	Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije	68
5.3.3.	Kvalitet embriona	69
5.3.4.	Uspeh VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od upotrebe metformina	70
5.4.	Uticaj vrednosti AMH-a na tok i ishod vantelesnog oplodjenja kod pacijentkinja sa PCOS-om.....	72
5.4.1.	Karakteristike ovarijalnog odgovora	72

5.4.2.	Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije.....	73
5.4.3.	Kvalitet embriona	74
5.4.4.	Uspeh VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti AMH-a.....	75
5.5.	Uticaj BMI-a na tok i ishod VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om	77
5.5.1.	Karakteristike ovarijalnog odgovora	77
5.5.2.	Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije.....	78
5.5.3.	Kvalitet embriona	78
5.5.4.	Uspeh VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti BMI-a.....	81
5.6.	Uticaj godina starosti na tok i ishod VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om	82
5.6.1.	Distribucija ispitanica po godinama starosti, BMI-u i hormonskom statusu.....	82
5.6.2.	Karakteristike ovarijalnog odgovora	83
5.6.3.	Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije.....	83
5.6.4.	Kvalitet embriona	84
5.6.5.	Uspeh VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od godina starosti.....	85
6.	DISKUSIJA.....	89
7.	ZAKLJUČAK.....	108
8.	LITERATURA	111

LISTA KORIŠĆENIH SKRAĆENICA

α EGF	– epidermalni faktor rasta
AES	– androgen excess society
AMH	– anti-Mullerov hormon
ART	– asistirane reproduktivne tehnologije
ASRM	– American society for reproductive medicine
BMI	– indeks telesne mase
CC	– klomifen citrat
DHEA	– dehidroepiandrosteron
DHEAS	– dehidroepiandrosteron sulfat
DM2	– šećerna bolest tipa II
E2	– estradiol
ESHRE	– European society of human reproduction and embriology
ET	– embriotransfer
FAI	– indeks slobodnih androgena
FSH	– folikulostimulirajući hormon
fT3	– slobodni trijodtironin
fT4	– slobodni tiroksin
GDF 9	– faktor diferencijacije rasta 9
GnRH	– hormon koji oslobađa gonadotropine
hCG	– humani horionski gonadotropin
HDL	– lipoprotein visoke gustine
hMG	– humani menopauzalni gonadotropin
HSG	– histerosalpingografija
IA	– inhibitori aromataze
IAP	– intraabdominalni pritisak
IGF I	– insulinu sličan faktor rasta I
IGFBP	– protein koji vezuje insulinu sličan faktor rasta
IR	– insulinska rezistencija
IUI	– intrauterina inseminacija
IVF	– <i>in vitro</i> fertilizacija
KAH	– kongenitalna adrenalna hiperplazija

LH	– luteinizirajući hormon
LOD	– laparoskopski ovarijalni drilling
NIH	– National Institute of Health
NKAH	– neklasična kongenitalna adrenalna hiperplazija
OHSS	– ovarijalni hiperstimulacioni sindrom
PCO	– policistični jajnik
PCOS	– sindrom policističnih jajnika
Pg	– progesteron
PRL	– prolaktin
SHBG	– protein koji vezuje polne hormone
T	– testosteron
TGF	– transformišući faktor rasta
TSH	– tireo stimulišući hormon
TVL	– transvaginalna laparoskopija
UZ	– ultrazvuk
VEGF	– vaskularni endotelni faktor rasta
VTO	– vantelesno oplodjenje

1. UVOD

Policistični ovarijalni sindrom (*Polycystic Ovarian Syndrome* – PCOS) jedan je od najčešćih endokrinoloških poremećaja žena u reproduktivnom dobu, nedovoljno poznate etiologije i patogeneze. Manifestuje se čitavim nizom kliničkih znakova i simptoma od kojih su tri najčešća: 1. poremećaj ovulacije; 2. povećano stvaranje androgena; 3. ultrazvukom utvrđen policističan izgled jajnika¹. PCOS je često udružen sa povećanom telesnom težinom, insulinskom rezistencijom (IR) i poremećajem u lučenju gonadotropina. Ovi parametri nisu ključni u postavljanju dijagnoze PCOS-a, ali utiču na klinički fenotip i reproduksijske i metaboličke rizike².

Stein i Leventhal su godine 1935. prvi opisali ovaj sindrom kao združenu pojavu amenoreje i policističnih jajnika što ponekad može biti praćeno hirzutizmom i povećanom telesnom težinom, iako prvi opisi sklerotičnih jajnika i hiperandrogenih simptoma datiraju barem 90 godina pre objave ovog epochalnog rada³. Sindrom policističnih jajnika postao je izuzetno zanimljiv svetskoj medicinskoj javnosti osamdesetih godina prošlog veka kada je utvrđeno da žene sa PCOS-om imaju veći rizik od nastanka abdominalne debljine, insulinske rezistencije, intolerancije glukoze, dijabetes mellitusa tipa II (DM2), dislipidemije i hipertenzije tj. metaboličkog sindroma. Kod ovih žena češće je poremećena vaskularna i endotelna funkcija što zajedno sa prethodno navedenim uzročnicima, utiče na povećan rizik nastanka kardiovaskularnih bolesti kod žena sa PCOS-om⁴.

PCOS se klinički karakteriše hroničnom anovulacijom, znacima hiperandrogenizma, znacima povećanog anabolizma, policističnim izgledom jajnika i subfertilitetom ili sterilitetom.

Poremećaj menstrualnog ciklusa je najčešća prisutna klinička slika kod pacijentkinja sa PCOS-om, uzrokovana izraženim poremećajima u razvoju i maturaciji folikula. Oko 75% pacijentkinja ima povećan nivo luteinizirajućeg hormona (LH) i poremećen odnos LH i folikulostimulirajućeg hormona (FSH). Hronična anovulacija manifestuje se oligomenorejom, a ređe i amenorejom.

Hiperandrogenizam klinički se karakteriše hirzutizmom, aknama, alopecijom ili virilizacijom, zatim biohemijski povišenim serumskim koncentracijama androgena, posebno testosterona (T) i androstenediona⁵. Policistični izgled jajnika nastaje kao posledica neadekvatne hormonske stimulacije, pri čemu folikuli sazrevaju samo do antralnog stadijuma kada nastaje tzv. folikularni arest koji se manifestuje velikim brojem mikrocisti. Ultrazvučna

vizualizacija je metoda izbora za otkrivanje tipične slike policističnih jajnika (*Polycystic ovary* – PCO). Nalaz PCO-a kod žena sa redovnim ovulatornim ciklusima bez znakova hiperandrogenizma nema klinički značaj i smatra se normalnim morfološkim varijetatom⁶.

PCOS se smatra najčešćom endokrinopatijom kod žena reproduktivnog doba. Procenjuje se da između 5–15% žena u reproduktivnom periodu ima PCOS. Iako su policistični jajnici čest nalaz u žena sa infertilitetom, tačna incidenca ovih pacijentkinja uključenih u program vantelesnog oplođenja (VTO) nije poznata⁷. U nedostatku poznavanja jasnog uzročnika i mehanizma nastanka, ovaj sindrom se definiše na osnovu dogovorenih kriterijuma. Naime, u svetu se koriste tri različita kriterijuma, što u mnogome otežava interpretaciju objavljenih istraživanja.

Malobrojnim studijama procenjivan je ishod vantelesnog oplođenja kod pacijentkinja sa PCOS-om (Mulders i saradnici 2003. godine, Heijnen i saradnici 2006. godine, Sahu i saradnici 2008. godine, Swanton 2010. godine). Kod žena sa PCOS-om nađene su više vrednosti estradiola (E2) na dan administracije humanog horionskog gonadotropina (*Human chorionic gonadotropin* – hCG), veći broj folikula, veći broj dobijenih oocita i veća je incidenca ovarijalnog hiperstimulacionog sindroma (*Ovarian hyperstimulation syndrome* – OHSS), a manja potrošnja gonadotropina koja ukazuje na povećanu osetljivost jajnika na stimulaciju⁸. Međutim, drugi autori nisu potvrdili ova istraživanja jer se dobijeni rezultati nisu razlikovali u odnosu na žene sa normalnim jajnicima⁹. Smanjenu stopu fertilizacije, kliničkih trudnoća i porođaja, a veću incidencu spontanih pobačaja neki istraživači dovode u vezu sa nepovoljnim uticajem povišenih vrednosti luteinizirajućeg hormona, androgena i indeksom telesne mase (engl. *Body mass index* – BMI) i njihovim nepovoljnim uticajem na maturaciju oocita, fertilizaciju i receptivnost endometrijuma¹⁰.

Detekcija i dobra dijagnostika PCOS-a može doprineti izboru adekvatnog tretmana u pripremi i postupku indukcije ovulacije za neku od metoda asistirane reproduktivne tehnologije, te smanjiti komplikacije i povećati procenat trudnoća. PCOS nije značajan samo zbog svoje visoke učestalosti, već i zbog brojnih zdravstvenih rizika kod žena obolelih od ovog sindroma.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Definicija policističnog ovarijalnog sindroma (PCOS-a)

Usled nedostatka jasnog uzročnika kao i patogenetskog mehanizma, ovaj sindrom se definiše na osnovu kliničkih simptoma. Pri tom treba imati na umu da je PCOS sindrom, što znači da označava skup znakova i simptoma koji karakterišu poremećaj za čije postavljanje dijagnoze ne postoji jedinstveni dijagnostički test. Iako se ovaj sindrom klinički manifestuje na vrlo heterogen način, dominiraju tri osnovna simptoma ili znaka:

1. poremećaj ovulacije;
2. povećano stvaranje androgena;
3. ultrazvučni nalaz policističnih jajnika.

Različite kombinacije navedenih znakova koriste se u svrhu postavljanja specifičnih dijagnostičkih kriterijuma. Budući da je PCOS funkcionalni poremećaj nejasne etiologije, njegova dijagnoza se još postavlja i na osnovu isključivanja bolesti koje se slično manifestuju².

2.2. Dijagnostički kriterijumi PCOS-a

Heterogenost kliničke slike sindroma policističnih jajnika razlog je što ne postoji jedinstveni kriterijum za dijagnozu. U posljednjih 70 godina predloženo je više različitih dijagnostičkih kriterijuma, ali do danas ni jedan nije univerzalno prihvaćen. Nepostojanje globalno prihvaćenog dijagnostičkog kriterijuma u mnogome otežava interpretaciju učinjenih studija, kao i bitno istraživanje etiologije, patogeneze, uspeha lečenja i kasnih posledica ovog sindroma. U svetu se danas koriste tri kriterijuma. Najčešće korišćen kriterijum za definiciju PCOS-a, koga smo se i mi držali tokom istraživanja, jeste Rotterdamski kriterijum.

2.2.1. NIH kriterijum

U američkoj literaturi se najviše koristi definicija Američkog nacionalnog instituta za zdravlje (US National Institutes of Health – NIH) iz 1990. godine. Prema ovom kriterijumu dijagnoza PCOS postavlja se na osnovu postojanja:

1. kliničkih znakova hiperandrogenizma i/ili biohemijski potvrđene hiperandrogenemije;
2. hronične oligo/anovulacije;

3. a nakon isključenja bolesti koje se slično manifestuju (Cushingov sindrom, kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH), hiperprolaktinemija i bolesti štitne žlezde)¹¹.

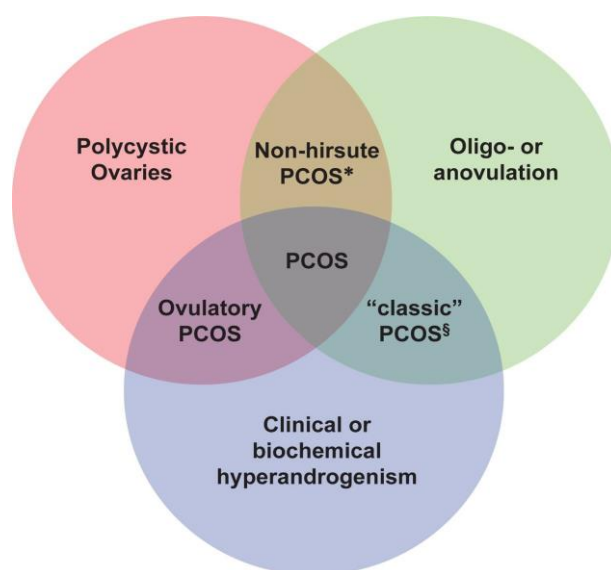
Ultrazvučni nalaz policističnih jajnika, može biti sugestivan za ovaj sindrom, ali njegovo postojanje nije nužno za postavljanje dijagnoze. NIH kriterijum definiše tri klinička fenotipa PCOS-a:

- hirzutizam, hiperandrogenemija i oligo/anovulacije;
- hiperandrogenemija i oligo/anovulacije;
- hirzutizam i oligo/anovulacije¹².

2.2.2. Rotterdamski kriterijum

Evropsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju (European Society for Human reproduction and Embriology – ESHRE) i Američko društvo za reproduktivnu medicinu (American Society for Reproductive Medicine – ASRM) u Rotterdamu 2003. godine objavili su konsenzus prema kojem se PCOS definiše prisustvom dva od tri navedena parametra:

1. oligo – i/ili anovulacija;
2. klinički i/ili biohemijski znaci hiperandrogenizma;
3. policistični izgled jajnika dokazan ultrazvukom, a nakon isključenja bolesti koje se slično manifestuju¹³.



Slika 1. Vennov dijagram ilustracije Rotterdamskih kriterijuma za PCOS.

Preuzeto: Lee TT, Rausch ME. Polycystic ovarian syndrome: role of imaging in diagnosis. Radiographics. 2012;32(6):1643-57.¹⁴

Diferencijalno-dijagnostički je potrebno isključiti druge dijagnoze sa sličnom kliničkom slikom. To su: neklasična kongenitalna adrenalna hiperplazija (NKAH), Cushingov sindrom, androgensekretujućí tumori, poremećaji štitne žlezde, hipogonadotropni hipogonadizam, hiperprolaktinemija, sindromi izrazite insulinske rezistencije (npr. dijagnoza hiperandrogene na inzulin rezistentne *acanthosis nigricans* (engl. *HARA-IN syndrome*)) kao i visoke doze egzogeno unesenih androgena¹³.

Ovaj dijagnostički kriterijum ne isključuje NIH kriterijum, već ga dodatno proširuje. Rotterdamski kriterijum naime uključuje i dva dodatna fenotipa:

- bolesnice sa ovulatornim ciklusima, ali sa kliničkim i/ili biohemijskim hiperandrogenizmom i ultrazvučnim nalazom policističnih jajnika;
- bolesnice sa policističnim jajnicima i oligo/anovulacijama bez znakova hiperandrogenizma¹².

2.2.3. AES kriterijum

Organizacija za stanja povezana sa povećanim stvaranjem androgena i sindrom policističnih jajnika (Androgen Excess and PCOS Society – AES-PCOS) objavila je treći konsenzus o dijagnostičkim kriterijumima PCOS¹². Prema ovom konsenzusu, dijagnoza PCOS-a se postavlja na osnovu prisustva tri znaka:

1. kliničkog i/ili biohemijskog dokaza preteranog stvaranja androgena;
2. disfunkcije jajnika (oligo-anovulacije i/ili ultrazvukom dokazanih policističnih jajnika);
3. isključenja bolesti koje se slično manifestuju.

Policistični izgled jajnika u ovom kriterijumu predstavljen je kao alternativa oligo-anovulaciji, a ne kao zaseban parametar u Rotterdamskom kriterijumu. Prema ovom kriterijumu, hiperandrogenizam je *conditio sine qua non* (od lat. „uslov bez kojeg ne može“) za postavljanje dijagnoze PCOS-a, stoga je isključen fenotip s oligo/anovulacijama, policističnim izgledom jajnika, a bez hiperandrogenizma.

Ovim kriterijumima definisano je ukupno devet fenotipova PCOS-a, i po njima je PCOS primarno hiperandrogeni poremećaj. Autori ovih kriterijuma naglašavaju da kliničke karakteristike simptoma PCOS-a ne moraju biti stalno prisutne, već mogu biti više ili manje izražene zavisno od spoljnih faktora (promene telesne težine, stila života i starosnog doba)¹⁵. Iako je sindrom policističnih jajnika često udružen sa debljinom (30–60% bolesnica), insu-

linskom rezistencijom i hiperinsulinemijom (50–70% bolesnica), ovi simptomi nisu uključeni u kriterijume za dijagnozu PCOS-a jer su često prisutni i u drugim poremećajima koji nisu povezani s PCOS-om¹⁶.

Tri gore navedena dijagnostička kriterijuma prikazana su u tabeli 1.

Tabela 1. Kriterijumi za postavljanje dijagnoze PCOS-a

KRITERIJUMI ZA POSTAVLJANJE DIJAGNOZE PCOS-a			
	NIH/1990	Rotterdam/2003	AES/2006
Dijagnostički kriterijumi	Zahteva istovremeno prisustvo:	Zahteva prisustvo najmanje dva od tri kriterijuma	Zahteva prisustvo:
	1. klinički i/ili biohemijski hiperandrogenizam	1. klinički i/ili biohemijski hiperandrogenizam	1. kliničkog i/ili biohemijskog hiperandrogenizma
	2. hronične anovulacije	2. oligo i/ili anovulacija	2. oligo/anovulacije i/ili PCOM
		3. PCOM	
Isključene bolesti	Kongenitalna adrenalna hiperplazija, androgen sekretujući tumori, Kušingov sindrom i hiperprolaktinemija	Kongenitalna adrenalna hiperplazija, androgen sekretujući tumori, Kušingov sindrom	Kongenitalna adrenalna hiperplazija, androgen sekretujući tumori, korišćenje androgena/anabolika, Kušingov sindrom, sindrom insulinske rezistencije, disfunkcija štitne žlezde i hiperprolaktinemija
Kliničke osobine	Hirzutizam, alopecija i akne	Hirzutizam, akne i androgena alopecija	Hirzutizam
Biohemijske osobine	1. Ukupni testosteron	1. Index slobodnog androgena ili slobodni testosteron	1. Index slobodnog androgena ili slobodni testosteron
	2. Slobodni testosteron	2. Ukupni testosteron	2. Ukupni testosteron
	3. Androstenedion	3. DHEA	3. DHEA
	4. DHEA		4. Androstenedion
PCOM	Nije uključen	Barem jedan jajnik da prikazuje 1. Dvanaest ili više folikula (2-9mm) 2. Volumen jajnika – 10 ml	Barem jedan jajnik da prikazuje 1. Dvanaest ili više folikula (2-9mm) 2. Volumen jajnika – 10 ml

NIH - National Institutes of Health, AES – Androgen Excess Society, PCOM – polycystic ovary morphology, DHEA – dehydroepiandrosterone

2.3. Prevalenca i incidenca PCOS-a

Na osnovu važećih kriterijuma, rasprostranjenost PCOS-a je između 5–10% u reproduktivnom periodu žene¹⁷. Teško je odrediti tačnu rasprostranjenost PCOS-a iz više razloga, a jedan od njih je korišćenje različitih kriterijuma za njegovu identifikaciju od strane zdravstvenih radnika.

Retrospektivna kohortna studija kojom je bilo obuhvaćeno 728 žena rođenih između 1973 i 1975 godine, imala je za cilj da analizira razliku u prevalenci PCOS-a između gore navedena tri kriterijuma. Svih 728 žena bilo je intervjuisano kada su bile starosti između 27 i 34 godine. Na osnovu NIH kriterijuma, kod $8,7 \pm 2\%$ žena je bio dijagnostikovani PCOS. Na osnovu Rotterdamskih kriterijuma, prevalenca je bila $11,9 \pm 2,4\%$. Na kraju, poštujući preporuke AES, prevalenca PCOS-a je iznosila $10,2 \pm 2,4\%$. Rezultati variraju uprkos tome što su iste žene analizirane za sva tri kriterijuma⁷. Slična studija je rađena 2009. godine kod Iranskih žena koje žive u gradu Isfahan u Iranu, kada je zabeleženo postajanje velikog raspona u rasprostranjenosti PCOS-a na osnovu korišćenja drugačijih kriterijuma. Prevalenca je procenjena na 7% za kriterijume NIH, 15,2% za Rotterdamski kriterijum i 7,92% za AES kriterijum¹⁸.

Još jedan problem za određivanje prevalencije PCOS-a je što bolest ostaje u velikom stepenu nedijagnostikovana. U istraživanju sprovedenom na 728 žena u SAD-u, kod 68-69% žena koje pate od PCOS-a, sindrom nije ranije dijagnostikovani⁷.

Utvrđeno je da prevalenca PCOS takođe varira u zavisnosti od etičke pripadnosti i geografske lokacije što ukazuje da razlog može biti genetika i razlike u navikama u ishrani.

Slično rasprostranjenosti PCOS-a, teško je utvrditi i tačnu učestalost ovog sindroma. Iako je PCOS prvi put prepoznat 1935. godine od strane Stein i Leventhala, sve do 1990. godine, kada su prvi put uvedeni kriterijumi NIH, bilo je teško utvrditi incidencu. Ponovo, raznovrsnost dijagnostičkih kriterijuma otežava određivanje incidence. Tokom poslednjih nekoliko godina, stiče se utisak o povećanju prevalencije ovog sindroma. Ipak, nije potpuno jasno da li je došlo do povećanja broja žena sa PCOS-om, ili su medicinski radnici, stičući nova saznanja, postali bolji u njegovom dijagnostikovanju.

Prema NIH kriterijumu učestalost ovog sindroma iznosi između 6,5–8%, što znači da od PCOS-a boluje svaka trinaesta, do petnaeste žene, odnosno da 105 miliona žena u svetu ima PCOS¹⁹. Učestalost sindroma policističnih jajnika je 15–22% ako poštujuemo Rotterdamski kriterijum za postavljanje dijagnoze²⁰. Dakle, prema ovom kriterijumu, gotovo svaka peta žena u reproduktivnom dobu boluje od PCOS-a. Ovaj se sindrom češće dijagnostikuje u

adolescentnom dobu. Poštujući Rotterdamski kriterijum, PCOS ima 25% adolescentkinja. Starenjem, paralelno sa fiziološkim smanjenjem ovarijalne rezerve, odnosno smanjenjem broja antralnih folikula, ublažava se hiperandrogenemija i češće su ovulacije⁷. Učestalost PCOS-a je povišena kod osoba sa povećanim indeksom telesne mase, insulinskom rezistencijom, dijabetesom tipa I ili II, anovulacijskom neplodnošću, prevremenom adrenarhom, gestacijskim dijabetesom u anamnezi i kod onih, kod kojih bliski član porodice boluje od PCOS-a.

2.4. Dijagnoza i klinička slika PCOS-a

Postavljanje dijagnoze PCOS-a vrši se u dva osnovna koraka:

1. odrediti postojanje znakova koji ukazuju na PCOS;
2. isključiti bolesti koje se takođe manifestuju povišenim stvaranjem androgena i oligo-anovulacijama.

Dijagnostički postupak zavisice od kriterijuma kojima se koristimo za postavljanje dijagnoze. U toku ovog istraživanja koristićemo se Rotterdamskim kriterijumima.

2.4.1. Oligo-anovulacija

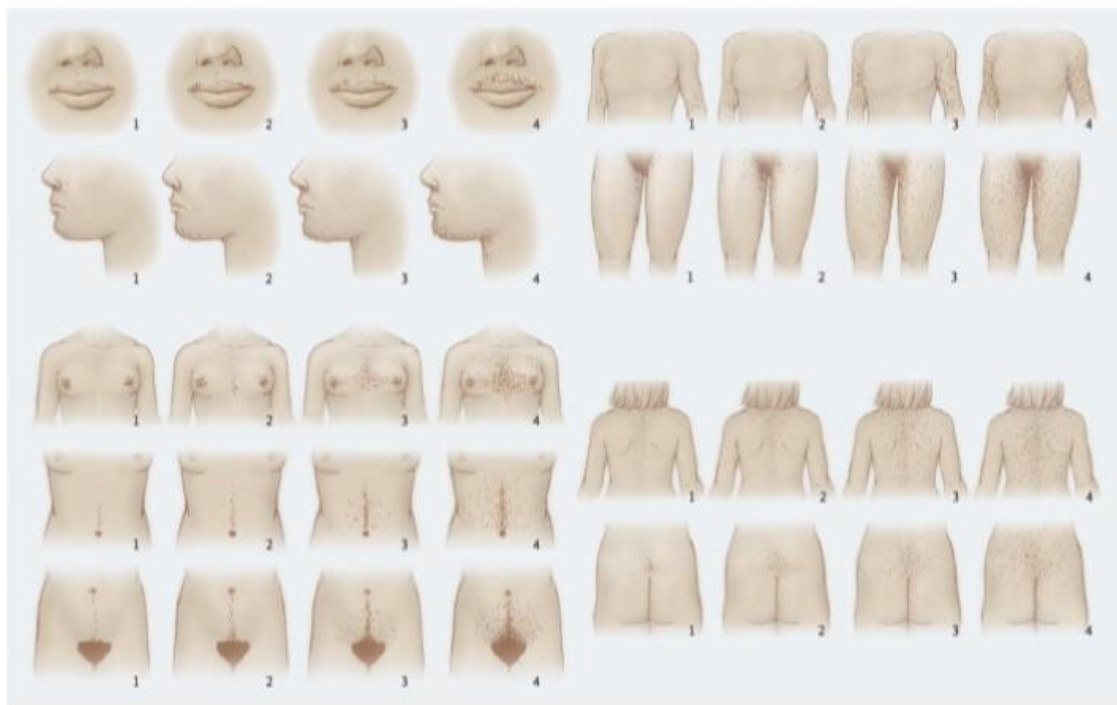
Oligo-anovulacije se obično klinički manifestuju u obliku oligomenoreje, a ređe kao amenoreja (20–30%). Redovni menstrualni ciklusi nisu garancija postojanja ovulacije. U oko 20–30% žena sa PCOS-om i eumenorejom i niskim vrednostima progesterona (Pg) određenim između 22. i 24. dana ciklusa, nađena je subklinička oligo/anovulacija. U žena sa hroničnom anovulacijom potrebno je određivanje vrednosti prolaktina (PRL) i luteinizirajućeg hormona u serumu, sa svrhom isključenja bolesti hipotalamusa i hipofize (vrednosti PRL između 20–30 µg/L često se nalaze kod PCOS-a zbog specifične hiperaktivacije hipofize, vrednosti iznad tog nivoa povezane su sa hiperprolaktinijom; vrednosti LH < 2 IU/L povezane su sa gonadotropnom deficijencijom). Hronična anovulacija i ultrazvukom utvrđen policističan izgled jajnika mogu biti prisutni i kod nekih oblika funkcionalne hipotalamičke amenoreje uzrokovane nedovoljnim unosom kalorija ili preteranom fizičkom aktivnošću. Za takve promene su karakteristične niske vrednosti estrogena u plazmi, i niske ili normalne vrijednosti gonadotropina. Poremećaj ovulacije razlog je smanjene plodnosti bolesnica sa PCOS-om, a dugotrajno, neoponirano delovanje estrogena povećava rizik za menoragije, disfunkcionalna krvarenja, hiperplaziju i karcinom endometrijuma².

2.4.2. Klinički hiperandrogenizam i/ili biohemijska hiperandrogenemija

Poznato je da 85% žena sa sindromom policističnih jajnika ima hiperandrogenemiju i hiperandrogenizam. Hiperandrogenizam je najizraženiji dijagnostički simptom sindroma policističnih jajnika.

Klinički hiperandrogenizam se manifestuje poremećajem pilosebaceozne jedinice u vidu hirzutizma, ređe pojavom akni (uglavnom kod mladih žena) i androgene alopecije (uglavnom kod starijih žena). Hirzutizam se definiše povećanim rastom terminalnih dlaka prema muškom načinu distribucije. Čak 85–95% žena sa hirzutizmom imaće PCOS. Od hirzutizma treba razlikovati hipertrihozu, kod koje postoji povećan rast veloznih dlaka bez muškog načina distribucije. Takva pojačana dlakavost ne zavisi od nivoa androgena. Ostali, retki uzroci hirzutizma su: idiopatski hirzutizam, kongenitalna adrenalna hiperplazija, korišćenje nekih lekova, hipertekozna, teža insulinska rezistencija, hiperprolaktinemija, tumori jajnika (Leydig-ćelijski, granulosa-teka ćelijski, hilus-ćelijski tumor), kao i tumori nadbubrežne žlezde.

Težinu hirzutizma procenjujemo modifikovanom Ferriman-Gallweyevom skalom (slika 2). Bodovima od 0 (ako nema dlaka) do 4 ocenjujemo svako od devet delova tela koji su osetljiva na androgene. Ako je zbir bodova veći od 8 tada govorimo o hirzutizmu.



Slika 2. Modifikovan Ferriman-Gallwey sistem bodovanja.

Preuzeto: Rosenfield RL. Clinical practice. Hirsutism. N Engl J Med. 2005;353(24):2578-88.²¹

Iako se hirsutizam smatra primarnim kliničkim indikatorom hiperandrogenizma, postoje ograničenja njegove kliničke primene: 1. ocena hirsutizma relativno je subjektivna metoda; 2. pojačanu dlakavost bolesnice uobičajeno odstranjuju pre kliničkog pregleda, što otežava evaluaciju; 3. neke žene nikada ne razviju kliničke znakove hiperandrogenizma, uprkos prisutnoj hiperandrogenemiji u cirkulaciji, zbog genetski uslovljenog smanjenog broja i/ili osetljivosti pilosebaceozne jedinice na androgene²².

Još uvek ne postoji jedinstven stav o aknama i androgenoj alopeciji kao jasnim kliničkim znacima hiperandrogenizma kod žena sa PCOS-om. Naime, brojne studije ukazuju na to da se ovi simptomi javljaju sa jednakom učestalošću kod žena sa PCOS-om, kao i u opštoj populaciji. Zbog toga se danas akne i alopecija smatraju nedovoljno pouzdanim znacima hiperandrogenizma, posebno ukoliko su one jedini klinički znak. Ipak, svakoj ženi sa aknama koje ne nestaju sa prestankom puberteta, odnosno postpubertalno nastalim aknama treba odrediti androgene u cirkulaciji, obzirom da 60–80% žena sa aknama koje nemaju hirsutizam, ima povišene androgene u cirkulaciji.

Biohemijska hiperandrogenemija se obično dijagnostikuje merenjem ukupnog testosterona u serumu, globulina koji vezuje polne hormone (*Sex hormone binding globulin* – SHBG), odnosno izračunavanjem indeksa slobodnog androgena (*Free androgen index* – FAI). Koncentracija drugih androgena u serumu poput androstendiona ili adrenalnog dihidroepiandrosteron sulfata (DHEAS), obično je povišena kod žena sa PCOS-om. Izolovano povišen nivo ovih androgena prisutan je u manje od 10% žena sa PCOS-om, zbog čega se smatra da rutinsko određivanje ovih hormona u serumu nije nužno. Definisane preteranog stvaranja androgena merenjem njihovih vrednosti u serumu ima nekoliko ograničenja koja se povezuju sa nepouzdanošću, nepoznavanjem jasnih granica normalnih vrednosti kod žena i velikom varijabilnošću laboratorijskih metoda koje se koriste²³.

Tabela 2. Normalne vrednosti androgena kod žena

Hormon	Referentne vrednosti
Ukupni testosteron (nmol/L)	0,2–2,5
Slobodni testosteron (pmol/L)	3,5–30
Androstendion (nmol/L)	1–12
DHEAS (μmol/L)	2–10
SHBG (nmol/L)	26,1–110,0

FAI se izračunava na osnovu vrednosti ukupnog testosterona i globulina koji vezuje polne hormone po sledećoj formuli: ukupni testosteron (nmol/L) x 100/SHBG (nmol/L)²⁴.

2.4.3. Ultrazvučni nalaz policističnih jajnika

Ultrazvučni dijagnostički kriterijumi za policistične jajnike su:

1. 12 ili više folikula (2–9 mm promera) u jajniku;
2. volumen jajnika veći od 10 ml;
3. za postavljanje dijagnoze dovoljno je prisustvo navedenih promena samo u jednom jajniku.

Ultrazvučni nalazi nisu sigurni u prvim ginekološkim godinama, peripubertetskom hiperandrogenizmu i adolescenciji. U adolescentkinja je potrebno postaviti dijagnozu PCOS-a merenjem volumena jajnika, obzirom da je merenje broja folikula manje pouzdano kada koristimo transabdominalnu sondu, posebno kod devojčica sa preteranom telesnom težinom. Od svih žena sa ultrazvučnim nalazom policističnih jajnika 90% ima PCOS²⁵.



Slika 3. Ultrazvučni izgled policističnog jajnika.

Preuzeto: Hiremath P, Tegnoor J. Follicle detection and ovarian classification in digital ultrasound images of ovaries, *Advancements and Breakthroughs in Ultrasound Imaging*, InTechOpen, UK (2013) 167–99.²⁶

2.4.4. Isključenje bolesti koje se slično manifestuju

Pri postavljanju dijagnoze PCOS-a, diferencijalno-dijagnostički treba isključiti sledeće bolesti i stanja: bolesti štitne žlezde, hiperprolaktinemiju, gonadotropinom, nekласičnu kongenitalnu adrenalnu hiperplaziju, Cushingov sindrom, virilizirajuće tumore, hipotalamičke amenoreje, akromegaliju, glukokortikoidnu rezistenciju, insulinsku rezistenciju, hipertekozu i korišćenje nekih lekova. Određivanjem gonadotropina – folikulostimulirajućeg hormona i luteinizirajućeg hormona, isključuju se hipotalamusno-hipofizni razlozi anovulacija (normalan raspon koji odgovara za ranu folikulinsku fazu iznosi: FSH: 2–10 IU/L, LH: 2–10 IU/L). Merenjem PRL-a isključuje se hiperprolaktinemija, a merenjem vrednosti hormona štitne žlezde: tireotropin stimulišućeg hormona (TSH), slobodnog trijodtironina (T3) i slobodnog tiroksina (T4), isključuju se poremećaji rada štitne žlezde. Određivanjem jutarnjih bazalnih vrednosti 17–hidroksiprogesterona (17–OHP) isključuje se nekласična kongenitalna adrenalna hiperplazija. Dobijene vrijednosti 17–OHP u ranoj folikulinskoj fazi < 3 nmol/L isključuju NKAH. Određivanje kortizola u 24–satnom urinu u svrhu isključenja Cushingove bolesti, vrši se samo kada se postavi klinička sumnja na ovu bolest. Insulinska rezistencija se identifikuje na osnovu bihemijskih i kliničkih karakteristika. Za dokazivanje insulinske rezistencije obično se koristi metoda računanja HOMA indexa (*Homeostasis model assessment*) prema formuli:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{koncentracija glukoze (mmol/L)} \times \text{insulin } (\mu\text{IU/mg})}{22,5}$$

pri čemu vrednost > 2,5 ukazuje na insulinsku rezistenciju.

Teža insulinska rezistencija obično se karakteriše kožnim promenama u vidu *achantosis nigricans* i predstavlja njenu kliničku karakteristiku. *Achantosis nigricans* su tamne, guste kožne fleke koje se nalaze na mestima prevoja. Uobičajene lokacije uključuju pazuh, prepone, vrat, zglobove prstiju na rukama i nogama. Visceralni ili centralni tip gojaznosti je još jedna klinička karakteristika IR-e, a karakteriše se nagomilavanjem masnog tkiva u predelu ramena, grudnog koša i abdomena².

2.5. Etiologija sindroma policističnih jajnika

Uzrok nastanka PCOS-a još nije poznat, ali učestala pojava ovog sindroma u pojedinim porodicama ukazuje na njegovu genetsku uslovljenost. Naime, poznato je da 35% majki i 40% sestara bolesnica sa PCOS-om, pati od istog poremećaja. Dodatno još 24%

sestara ima hiperandrogenemiju. Braća bolesnica sa PCOS-om imaju veću učestalost dislipidemije, insulinske rezistencije i hiperandrogenemije²⁷. Dokazano je da oko 70% članova porodice žena sa PCOS-om ima hiperinsulinemiju, još jednu karakteristiku PCOS-a²⁸. Obzirom na vrlo heterogenu kliničku i biohemijsku sliku kojom se ovaj sindrom manifestuje, teško je verovati da se radi o poremećaju na nivou samo jednog gena. Visoka učestalost i velika raznolikost fenotipova, verovatno je posledica međusobnog uticaja faktora sredine i manjeg broja ključnih gena, posebno onih koji su uključeni u biosintezu androgena, a kod nekih osoba i insulina i proinflamatornih gena. PCOS se smatra vrlo kompleksnim genetskim poremećajem poput dijabetesa tipa II, šizofrenije ili astme, gde zapravo čitav niz predisponirajućih gena podstaknuti nekim uzročnicima sredine, posebno nutritivnim ili nekim intrauterinim činiocem, dovode do nastanka bolesti²⁹.

Neki poremećaji u intrauterinom periodu i peripubertetu povećavaju rizik za kasniji nastanak PCOS-a. Niska telesna težina na rođenju za gestacijsku starost je predisponirajući faktor i povećava rizik od razvoja PCOS-a za 20%^{30,31}. Preвременa adrenarha (pubarha pre osme godine života) za 50% povećava rizik za nastanak PCOS-a nakon puberteta³². Prekomerna telesna masa u juvenilnom i adolescentnom dobu, naj snažniji je okidač za razvoj i pogoršanje simptoma PCOS-a³¹.

Takođe, utvrđene su i neke hormonske abnormalnosti kod braće i sestara žena koje pate od PCOS-a. Upoređivane su vrednosti hormona 86 braće i sestara žena koje pate od PCOS-a, sa 100 kontrolama. Nivoi testosterona, DHEAS, androstenediona, i slobodni indeks androgena, svi su bili veći među sestrama žena sa PCOS-om nego u kontrolnoj grupi. Takođe, braća sa sestrama koje pate od PCOS-a imaju povišen nivo DHEAS-a. Ovo govori u prilog genetskoj komponenti u patogenezi ove bolesti³³. Dalja istraživanja morala bi biti urađena da se proceni genetska komponenta PCOS-a. Iako se čini da se radi o autozomno dominantnom nasleđivanju, ne postoji dovoljno dokaza da potvrdi ovu teoriju. Novim istraživanjima na ljudskom genomu, možda će jednog dana biti moguće identifikovati gen odgovoran za razvoj PCOS-a. Najveća pažnja je usmerena prema defektima u: ovarijalnoj biosintezi i delovanju androgena, sekreciji i delovanju insulina, hipotalamusno-hipofiznoj osi i endokrinologiji masnog tkiva.

Sve je više dokaza da disregulacija sinteze androgena u teka ćelijama jajnika ima ključnu ulogu u patogenezi PCOS-a. Dokazano je kako teka ćelije policističnih jajnika zadržavaju povećanu aktivnost enzima odgovornih za stvaranje androgena pri serijskom rasadivanju kulture ćelija, što znači da je svojstvo povećanog stvaranja androgena intrinzično, odnosno nije uzrokovano ekstraovarijalnim stimulusima, poput povećane stimulacije sa LH

odnosno hiperinsulinemijom. Taj nalaz podupire tezu da je programirani hiperandrogenizam teka ćelija uzrokovan ili genetskim uzročnicima, ili je uzrokovan epigenetskim uticajima. Pretpostavlja se da do disregulacije sinteze androgena, odnosno programiranja fenotipskih karakteristika PCOS-a, dolazi već tokom intrauterinog života fetusa. U studijama na primatima dokazano je da izlaganje povišenim vrednostima androgena u trudnoći dovodi do fenotipskih znakova tipičnih za PCOS³⁴. Zavisno od nedelje trudnoće u kojoj se fetusi izlažu androgenima, u kasnijem životu nastaju različiti fenotipovi PCOS-a³⁵. Ova zapažanja dovela su do pretpostavke da hiperandrogenizam majke, kakav se vidi kod trudnica sa PCOS-om, može aktivirati fetalnu nadbubrežnu žlezdu, ali i jajnike, i time dovesti do nastanka PCOS-a.

Prema dosadašnjim saznanjima, aromataza posteljice i visok SHBG u serumu tokom trudnoće, štiti fetus od povišenih vrednosti androgena majke. Potencijalni izvor gestacijskog hiperandrogenizma odgovornog za programiranje PCOS-a u ljudi nije razjašnjen. Majčin i/ili fetalni hiperandrogenizam, povezan sa smanjenom aktivnošću SHBG i aromataze u placenti, može biti jedan od genetski uslovljenih mehanizama. Kod dece majki sa PCOS-om, odmah postpartalno su nađene povišene vrednosti anti-Müllerovog hormona (AMH), koji govori u prilog povišene intrauterine androgene aktivnosti fetalnih jajnika³⁶.

2.6. Patofiziologija sindroma policističnih jajnika

Danas se smatra da je mehanizam nastanka PCOS-a jedan od najsloženijih patofizioloških mehanizama u medicini. Sindrom policističnih jajnika je endokrinološko-metabolički poremećaj u kome više predisponirajućih gena, u kombinaciji sa faktorima sredine (posebno nutritivnim), uzrokuje pojavu heterogene kliničke slike²⁹. Središnji je poremećaj u jajniku, ali je on nedvosmisleno povezan sa poremećajima na nivou hipofizno-hipotalamusnoj osi, kao i poremećajima u sekreciji i djelovanju insulina³⁷.

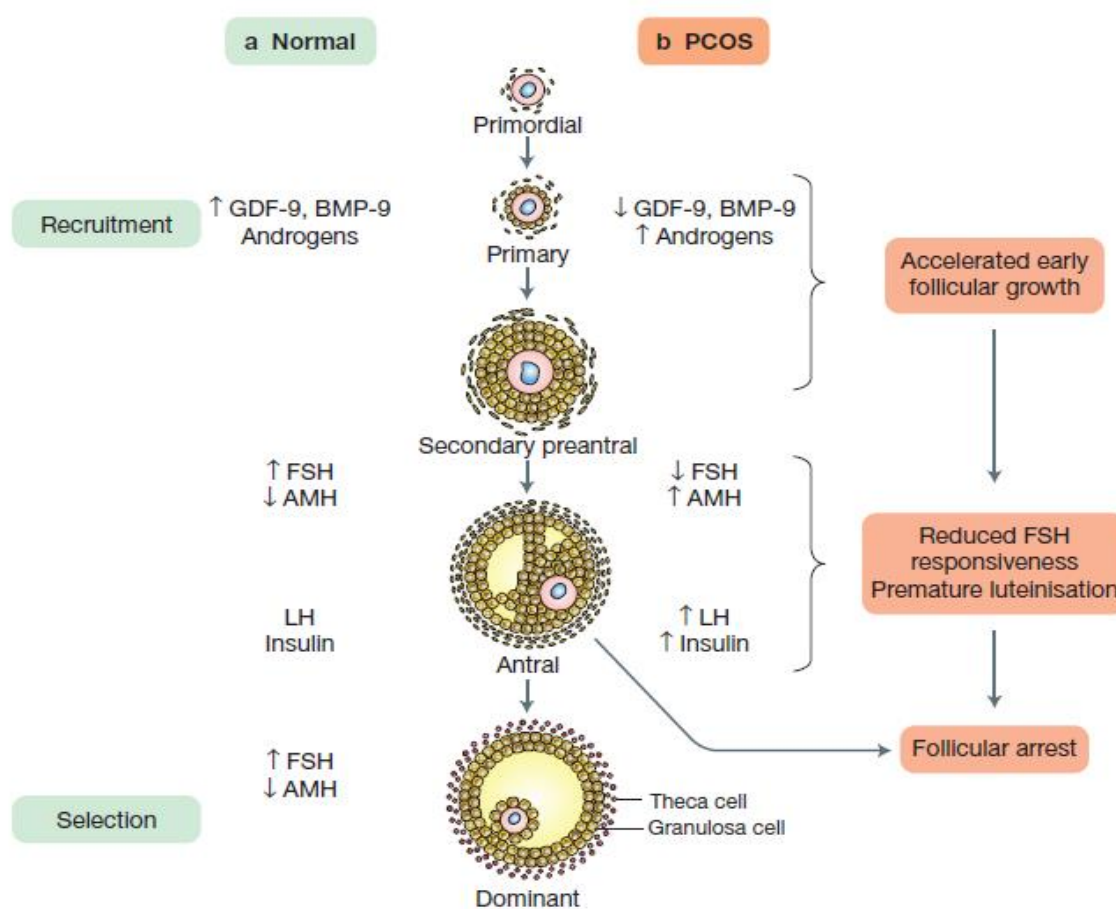
2.6.1. Poremećena folikulogeneza

Jajnik je glavni izvor androgena u bolesnica sa PCOS-om. Glavno mesto sinteze androgena je sloj teka-ćelija u razvojnom folikulu³⁸. Molekularni i ćelijski mehanizmi koji su u osnovi povećanog stvaranja androgena, u jajniku kod bolesnica sa PCOS-om, predmet su intenzivnih istraživanja. *In vitro* ogledi na sveže izolovanim kulturama teka-ćelija iz policističnih jajnika, ukazuju na pojačano bazalno i stimulirano lučenje androgena i njihovih prekursora u poređenju sa teka-ćelijam zdravih jajnika^{39,40}. Ekstraovarijalni faktori koji utiču

na pojačanu biosintezu androgena jesu povećana sekrecija LH-a, kao i povišen nivo insulina koji svoje delovanje ostvaruje stimulacijom signalnih puteva u ćelijama jajnika³⁷.

Broj primordijalnih folikula (rezervni pool) kod žena sa PCOS-om jednak je kao i kod zdravih žena. Nasuprot tome, policistični jajnici sadrže tri puta veći broj antralnih folikula (2–5 mm) od normalnih jajnika. Takođe se zna da folikuli policističnih jajnika prestaju da rastu kada dostignu veličinu od 4–7 mm. Zbog toga se pretpostavlja da genetski uslovljen ovarijalni hiperandrogenizam dovodi do dva osnovna poremećaja na nivou folikula:

1. povećanog rasta velikog broja malih folikula;
2. zastoja u rastu i razvoju folikula, odnosno aresta folikula.



Slika 4. Normalna folikulogeneza i folikularni defekt kod PCOS-a.

Preuzeto: Diamanti-Kandarakis E. Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert Rev Mol Med.* 2008;30;10:e3.⁴¹

Danas se vrlo malo zna o molekularnim mehanizmima koji kontrolišu regrutovanje i rani rast folikula. Eksperimentalnim studijama na Rhesus-majmunicama pokazalo se da kratkotrajna izloženost androgenima stimuliše rane stadijume rasta folikula. Ovi stadijumi

rasta ne zavise od faze ciklusa, ili od stimulacije gonadotropinima. Stimulacija androgenima odvija se preko androgenih receptora koji se nalaze u ćelijama granuloze i teka-ćelijama. Ako se izlaganje androgenima nastavi, tokom daljeg perioda dolazi do kolapsa folikula u ovarijalnu stromu. Posledično dolazi do hipertrofije ovarijalne strome, nalaz tipičan za PCOS i hronično izlaganje androgenima^{42,43}.

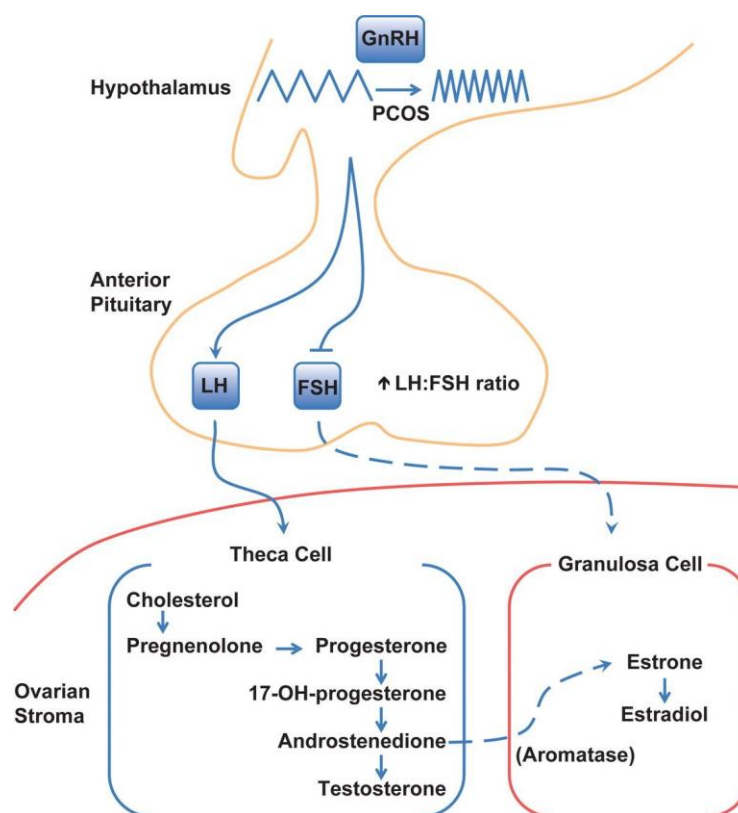
Poznato je da androgeni dovode do proliferacije teka i granuloza ćelija, te da je ovaj efekat posebno vidljiv na malim folikulima bogatim androgenim receptorima. Ovaj trofički efekat androgena na teka i granuloza ćelijama, iskazuje se preko amplifikacije FSH-a, pojačavanja delovanja insulinu sličnog faktora rasta I (*Insulin growth factor – IGF I*) i ekspresije gena za IGF I receptor. Jasno je da disregulacija teka ćelija nije jedini krivac za intraovarijalni hiperandrogenizam. Inhibin A, čiji se prekursorski protein pro- α C (*α -inhibin precursor protein*) pojačano stvara kod žena sa PCOS-om, povećava LH stimulirano stvaranje androgena.

Zaustavljen rast folikula, koji nalazimo u policističnom jajniku, ne može se u celosti objasniti izlaganjem androgena. Osim toga u granuloza ćelijama jajnika pojačano se stvara anti-Mullerov hormon, koji dodatno povećava LH i cAMP-om uzrokovanu indukciju ekspresije citohrom P450 17alfa hidroxilaze/17,20 laze (CYP17). Čini se da i neki činioci oocite mogu imati ulogu u regulaciji aktivnosti teka ćelija. Faktor diferencijacije rasta 9 (*Growth differentiation factor-9, GDF-9*) koji se luči iz oocite blokira bazalno i LH uzrokovano lučenje androgena. Vrednosti GDF-9 kod žena sa PCOS-om su snižene. Androgenima uzrokovan arest folikula nije u potpunosti objašnjen.

Pretpostavlja se da do folikularnog aresta dolazi zbog povećanog stvaranja lokalnih inhibitornih faktora delovanja FSH, od kojih je AMH glavni kandidat. Dva, do tri puta više vrednosti AMH-a, koje se luče iz velikog broja malih folikula policističnih jajnika, inhibiraju učinak FSH-a na aktivnost aromataze, i time dovode do zastoja u rastu i razvoju folikula⁴⁴. Čini se da hiperinsulinemija, koja dovodi do prevremene diferencijacije granuloza ćelija, odnosno pojave LH receptora, kao i neke abnormalnosti oocite poput smanjene ekspresije GDF-9, dodatno doprinose arestu folikula. Obzirom da su folikuli zaustavljeni u rastu, izostaje selekcija dominantnog folikula, ovulacija i stvaranje progesterona⁴⁵.

2.6.2. Neuroendokrinološki poremećaji

Niske vrednosti progesterona dovode do povećane pulzabilnosti hormona koji oslobađa gonadotropine (*Gonadotropin releasing hormone* – GnRH) što povećava nivo, frekvenciju i amplitudu LH-a, dok se normalno ili sniženo luči FSH. Karakteristično je povećan odnos LH/FSH⁴⁶. Povišen nivo androgena, takođe, povećava pulzabilnost GnRH-a i smanjuje osetljivost hipotalamusa na progesteron. Trajno povećanje pulzabilnosti GnRH-a za posledicu ima podizanje nivoa LH-a, što je vidljivo u 70% žena sa PCOS-om. Povišene vrednosti LH-a dodatno stimulišu funkciju enzima pod nadzorom P450c17 α u teka ćelijama, odnosno proizvodnju androgena. Povišene vrednosti LH-a su odgovorne i za nastanak prevremene luteinizacije, što se dovodi u vezu i sa povećanim rizikom nastanka ranih spontanih pobačaja u žena sa PCOS-om. Zbog povišenih vrednosti inhibina B i slobodnih estrogena u cirkulaciji, kao i lokalnih parakrinih učinaka androgena, AMH-a, folistatina, GDF-9, proteina koji veže insulinu sličan faktor rasta (*Insulin growth factor binding protein* – 4, IGFBP-4), transformišućeg faktora rasta (*Transforming growth factor* – TGF), te epidermalnog faktora rasta (*Epidermal growth factor α* – α /EGF) smanjena je aktivnost FSH-a, što za posledicu ima promenjen FSH/LH odnos. Snižena aktivnost FSH-a bitno doprinosi anovulaciji⁴⁴.



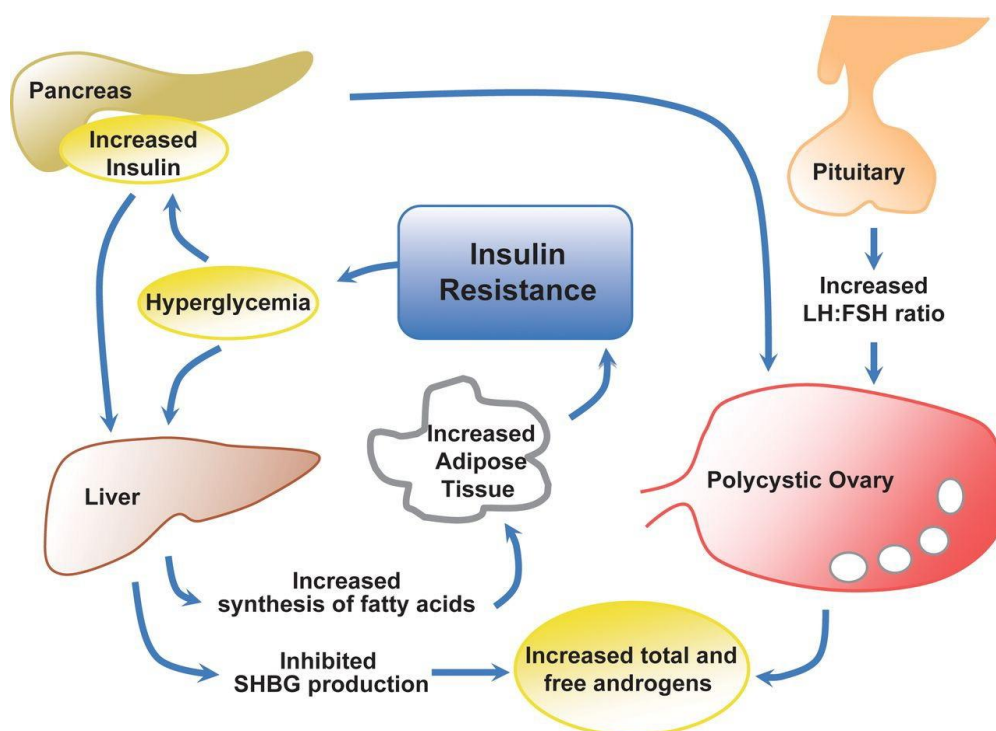
Slika 5. Hiptalamus-hipofizno-gonadna osa u PCOS-u.

Preuzeto: Lee TT, Rausch ME. Polycystic ovarian syndrome: role of imaging in diagnosis.

Radiographics. 2012; 32(6):1643-57.¹⁴

2.6.3. Uticaj insulina i insulinske rezistencije

U patofiziološki mehanizam nastanka PCOS-a, upliće se insulin i insulinska rezistencija. Kao što je prethodno navedeno, gotovo 80% žena sa PCOS-om i povećanom telesnom težinom, kao i oko 30–40% žena sa PCOS-om i normalnom telesnom težinom, ima IR. Intoleranciju glukoze ima oko 40% žena sa PCOS-om⁴⁷. Učestalost intolerancije glukoze nešto je niža u evropskoj populaciji žena sa normalnom telesnom težinom⁴⁸. Mehanizam nastanka insulinske rezistencije kod žena sa PCOS-om nije u potpunosti objašnjen. Debljina sama po sebi (iako uvek uzrokuje određen stepen insulinske rezistencije), nije dovoljna za objašnjenje IR, obzirom da i žene sa malom telesnom težinom i PCOS-om mogu imati insulinsku rezistenciju, dok sve žene sa povišenom telesnom težinom ne razvijaju PCOS-a. Hiperandrogenemijom se takođe ne može objasniti insulinska rezistencija kod PCOS-a, budući da davanje antiandrogenih lekova, kao ni kompletna blokada ovarijalne steroidogeneze dugotrajnom primenom GnRH analoga, ne dovodi do potpunog smanjenja insulinske rezistencije⁴⁹.



Slika 6. Uloga insulinske rezistencije kod PCOS-a.

Preuzeto: Lee TT, Rausch ME. Polycystic ovarian syndrome: role of imaging in diagnosis. Radiographics. 2012; 32(6):1643-57.¹⁴

Danas se smatra da insulinska rezistencija kod žena sa PCOS-om, nastaje zbog postreceptorskog poremećaja u metabolizmu insulina na nivou perifernih tkiva. Naime, studije su

pokazale da kod oko 50% žena sa PCOS-om, adipociti i fibroblasti pokazuju povišenu serinsku fosforilaciju, dok sniženu tirozinsku fosforilaciju pokazuju nakon vezivanja insulina za svoj receptor. Povišena serinska fosforilacija dovodi do zaustavljanja signalnog puta insulina, što za posledicu ima blago povišenje bazalne aktivnosti insulina i smanjen odgovor ćelije na insulin. Paradoksalno, serinska fosforilacija β lanca insulinskog receptora dovodi do aktivacije adrenalnog i ovarijalnog P450c17 enzima, što za posledicu ima povećanje aktivnosti 17,20-laze i produkcije androgena. Jednostavno rečeno, serinska fosforilacija umesto tirozinske fosforilacije predstavlja mehanizam isključenja transporta glukoze, odnosno mehanizam uključenja hiperprodukcije androgena. Uzrok serinske fosforilacije nije poznat, i pretpostavlja se da je genski uslovljen⁵⁰.

Brojne su posledice disregulacije hiperinsulinemije. Na nivou teka ćelija insulin stimuliše bazalnu i LH indukovanu aktivnost P450c17, što za posledicu ima usmeravanje steroidogeneze prema biosintezi androgena. Insulin stimuliše proliferaciju teka ćelija i smanjuje njihovu apoptozu. On takođe povećava ekspresiju receptora za lipoprotein visoke gustine (*High density lipoprotein* – HDL), čime se povećava unos holesterola potrebnog za biosintezu androgena. Na granulosa ćelijama, hiperinsulinemija dovodi do smanjenja aktivnosti aromataze i inhibira sintezu IGFBP-1, što za posledicu ima povećanje nivoa slobodnog IGF-1 i povećanu produkciju androgena. Ukratko, hiperinsulinemija, menjanjem odnosa između progesterona i estradiola, utiče na selekciju dominantnog folikula, te povećanjem proliferacije granulosa ćelija smanjuje normalnu folikularnu atreziju.

Na nivou hipotalamusa i hipofize, hiperinsulinemija podstiče bazalnu i GnRH stimulisanu ekspresiju i sekreciju LH-a i FSH-a. Stoga, povišene vrednosti insulina podstiču lučenje LH-a, što dodatno doprinosi hiperandrogenemiji. Na nivou jetre, hiperinsulinemija dovodi do pada produkcije SHBG i IGFBP-1, čime se dodatno pogoršava hiperandrogenemija. Dakle, hiperinsulinemijom bi se mogli objasniti svi klinički i laboratorijski znaci PCOS-a. Ali činjenica je da nisu sve žene sa PCOS-om rezistentne na insulin, kao i da nemaju posledičnu hiperinsulinemiju, što ukazuje da ovi poremećaji ipak nisu neophodni za nastanak PCOS-om kod velikog broja žena. Međutim, novije studije su pokazale da primena diazoksida, čak i kod mršavih žena sa PCOS-om kod kojih su nađene normalne vrednosti insulina, dovodi do smanjenja slobodnog testosterona i porasta SHBG-a u cirkulaciji. Takav učinak nije primijećen kod zdravih žena. Navedeni rezultat ukazuje da insulin doprinosi nastanku hiperandrogenemije, čak i kod žena koje imaju normalnu osetljivost na insulin, kao i njegove normalne vrednosti⁵¹. *In vitro* molekularne studije pokazuju da su i fiziološke

koncentracije insulina dovoljne za stimulaciju pojačane sinteze androgena u teka ćelijama PCOS-a, dok su suprafiziološke vrednosti nužne da bi se isti učinak postigao u normalnim ćelijama. Dakle, očigledno je da su teka ćelije PCOS-a hiperosetljive na delovanje insulina, čak ukoliko se on luči i u fiziološkim koncentracijama. Ta hiperosetljivost na insulin verovatno je genetski uzrokovana²⁹.

2.6.4. Gojaznost i uloga adipokina

Gojaznost je još jedna komponenta PCOS-a koja može doprineti patogenezi poremećaja. Ne samo da je gojaznost češća među ženama sa PCOS-om, već istraživanja pokazuju da gojaznost može pogoršati mnoge manifestacije PCOS-a, uključujući nivo androgena i insulinsku rezistenciju. Gojazne žene koje pate od PCOS-a generalno imaju veće koncentracije androgena u serumu i smanjen odgovor na tretmane plodnosti kada su u poređenju sa mršavim ženama sa PCOS-om. Gojazne žene sa PCOS-om imaju veću nepravilnost menstrualnog ciklusa u poređenju sa ne-gojaznim pacijentima⁵².

Znači, gojaznost ima značajan uticaj na kliničke, hormonske i metaboličke značajnosti PCOS-a. Poznato je da čak i umerena gojaznost ($BMI > 27 \text{ kg/m}^2$) je povezana sa većom učestalošću anovulacija, spontanim pobačajima i komplikacijama u kasnijoj trudnoći, u smislu gestacijskog dijabetesa i hipertenzije. Oko 30–70% žena sa PCOS-om (zavisno od zemlje u kojoj se istraživanje vrši), ima povećanu telesnu težinu ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$), što je značajno veća učestalost od one u opštoj populaciji. Preovladava androidna gojaznost i povećana količina visceralne masti. Čak i kod žena sa PCOS-om i normalnom telesnom težinom, nađena je veća akumulacija visceralnog masnog tkiva u odnosu na opštu populaciju⁵³. Abdominalna debljina povezana je sa nastankom insulinske rezistencije, kao i sa povećanim rizikom nastanka dijabetesa tipa II i kardiovaskularnih bolesti.

U 2005. godini jedna studija je potvrdila mnoge od tih nalaza. Svrha ove studije bila je da proceni uticaj gojaznosti na manifestaciju PCOS-a. Hormonski profil, metaboličke abnormalnosti i kliničke prezentacije bolesti su ocenjivane kod 192 žene sa PCOS-om, podeljene u dve grupe na osnovu BMI-a (grupa sa BMI-om većim od 25 i grupa sa BMI-om manjim od 25) i 65 žena u kontrolnoj grupi. Rezultati istraživanja pokazali su da gojazne žene sa PCOS-om imaju veću učestalost akantozne nigrikans (35,71% u odnosu na 6,56%), viši nivo slobodnih androgena (3,4 nmol/L u odnosu 1,75 nmol/L), niži nivo SHBG-a (108,7 nmol/L u odnosu na 192,49 nmol/L) i veću prevalencu insulinske rezistencije (82,76% u odnosu na 20,49%)⁵⁴.

Čini se da je za nastanak androidne akumulacije masti primarno odgovoran uticaj androgena na adipocite. U eksperimentima na primatima dokazano je da davanje androgena majkama u ranoj trudnoći, dovodi do nakupljanja abdominalne, pogotovo visceralne masti u kasnijem životu. Takođe rana androgenizacija fetusa povećava vrednosti slobodnih masnih kiselina u plazmi, što dovodi do insulinske rezistencije^{34,35}. Androgeni inhibiraju diferencijaciju adipocita i moduliraju lipogenezu i lipolizu. Testosteron dovodi do smanjenog insulinom-stimulišućeg unosa glukoze, što je učinak selektivan za insulinsku signalizaciju prenosa glukoze. Posledično, hiperandrogenizam može dovesti do neispravne insulinske signalizacije u žena sa PCOS-om kod kojih hiperinsulinemija povećava proizvodnju androgena, što zauzvrat podstiče nastanak insulinske rezistencije u perifernim tkivima⁵⁵.

Abdominalna debljina je povezana i sa promenjenom sekrecijom nekoliko peptidnih hormona koji se stvaraju u adipocitima i nazivaju adipokinima. Adipokini imaju ključnu ulogu u homeostazi tela uključujući regulaciju unosa hrane, potrošnju energije, delovanje insulina, metabolizam glukoze i lipida, angiogenezu, regulaciju krvnog pritiska i mehanizme koagulacije. Razumevanje biološkog značaja i delovanja adipokina kod bolesnica sa PCOS-om još uvek je u začetku. U novije vreme se pretpostavlja da kod žena sa PCOS-om postoji začarani krug zasnovan na povećanom stvaranju androgena u jajnicima koji promovišu abdominalnu akumulaciju masti i disfunkciju visceralnog masnog tkiva, što indukuje poremećaj u lučenju adipokina, a to za posledicu ima nastanak insulinske rezistencije sa kompenzatornom hiperinsulinemijom koja potom ponovno pojačava stvaranje androgena u jajnicima i nadbubrežnoj žlezdi⁵⁵. Međutim, studije o poremećenom lučenju adipokina kod bolesnica sa PCOS-om, nezavisno od BMI-a, daju kontroverzne i nekonzistentne rezultate. Delimično se to može objasniti heterogenom manifestacijom bolesti koja se prikazuje čitavim nizom kliničkih i biohemijskih karakteristika, odnosno brojnim podtipovima PCOS-a. Zato je zanimljivo istražiti da li se razlikuju vrednosti adipokina kod bolesnica sa različitim fenotipskim i biohemijskim karakteristikama PCOS-a.

Sve je više studija koje govore u prilog tome da adipokini mogu predstavljati zanimljivu vezu između hiperandrogenemije, centralne akumulacije masti i insulinske rezistencije, hiperlipidemije, hronične inflamacije, odnosno karakterističnih metaboličkih poremećaja bolesnica sa PCOS-om. Novije studije navode da upravo promene u lučenju adipokina prethode nastanku insulinske rezistencije, hronične upale i ateroskleroze^{56,57}.

2.7. Posledice i rizici PCOS-a

Posledice PCOS-a osećaju se tokom celoga života. Čini se da deca sa ovim sindromom još intrauterino pokazuju veću učestalost zastoja u rastu, a tokom prve godine života brže dodaju na težini, što kasnije stvara rizik za insulinsku rezistenciju i šećernu bolest tipa 2⁵⁸.

Takođe, devojčice sa PCOS-om imaju prevremenu pubarhu (pre osme godine života) i prevremenu menarhu⁵⁹. Tokom adolescencije i u reproduktivnom periodu, češći su neredovni menstrualni ciklusi, akne, neplodnost i karcinom endometrijuma. Kod žena sa PCOS-om veća je učestalost spontanih pobačaja, gestacijskog dijabetesa, hipertenzije i preeklampsije. Žene sa ovim sindromom uglavnom, kao rezultat komplikacija u trudnoći kao što su gestacijski dijabet, hipertenzija i preeklampsija, češće rađaju carskim rezom, imaju veću učestalost prevremenih porođaja kao i viši perinatalni mortalitet. Kod žena sa PCOS-om češća je gojaznost, intolerancija glukoze, insulinska rezistencija, dislipidemija i diabetes tipa 2. Češće je poremećena vaskularna i endotelna funkcija, što zajedno sa prethodno navedenim činiocima utiču na povećanje rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti kod žena sa PCOS-om. Kod ovih žena češća je i apneja u spavanju, masna degeneracija jetre i depresija¹.

Studije su pokazale da 7–15% žena sa PCOS-om ima šećernu bolest tipa 2 do 30-te godine života, što je znatno veća učestalost od 1,4%, koliko se nalazi u žena bez PCOS-a. Žene sa ovim sindromom imaju i veću učestalost hipertenzije, dislipidemije, disfunkcije endotela i kardiovaskularnih bolesti⁶⁰. Dislipidemija se nalazi kod 70% žena sa PCOS-om⁶¹. Brojne studije ukazuju na povećanu učestalost ateroskleroze u odnosu na opštu populaciju⁶². Stiče se utisak da postoji povećan rizik ranog nastanka kardiovaskularnih bolesti kod žena sa PCOS-om. Veća učestalost kardiovaskularnih bolesti nađena je i kod žena u postmenopauzi koje su prethodno bolovala od ovog sindroma⁶³. Iako PCOS izaziva povećanje rasprostranjenosti kardiovaskularnih faktora rizika, malo je dokaza koji ukazuju na vezu sa povećanjem kardiovaskularnih bolesti. Retrospektivna kohortna studija rađena u Minnesoti u periodu od 1966. do 1988. godine, imala je za cilj da uporedi faktore kardiovaskularnog rizika u 309 žena sa PCOS-om i 343 žena bez ovog sindroma. Kod žena sa PCOS-om nije primećen veći broj kardiovaskularnih bolesti, uključujući infarkt miokarda, bajpas operacije koronarnih arterija, smrt usled kardiovaskularnih bolesti ili moždanog udara. Poslednje praćenje je sprovedeno kod žena srednje starosne dobi od 46,7 godina, pri čemu se došlo do zaključka da bi rezultati možda bili drugačiji ako bi se praćenje ovih pacijentkinja sprovelo u kasnijoj životnoj dobi⁶⁴.

Iako postoji malo dokaza da podrži vezu između kardiovaskularnih bolesti i prisustva PCOS-a, i dalje ostaje veza između ovog sindroma i faktora rizika za kardiovaskularne bolesti. Nekim narednim studijama, koje bi pratile žene duži vremenski period, možda bi se mogla naći veza između PCOS-a i kardiovaskularnih bolesti. Do tada, kontrola insulinske rezistencije i gojaznosti treba da budu primarni cilj žena sa PCOS-om.

Žene sa PCOS-om imaju povećan rizik za razvoj metaboličkog sindroma u odnosu na opštu populaciju. Uočena je jasna veza između PCOS-a i razvoja metaboličkog sindroma. Metabolički sindrom će razviti 46% žena sa PCOS-om. Učestalost metaboličkog sindroma kod žena u dobi od 40 godina, jednaka je učestalosti metaboličkog sindroma kod žena od 70 godina bez PCOS-a. Metabolički sindrom je skup simptoma udruženih sa insulinskom rezistencijom. Dijagnoza se zasniva na prisustvu triju ili više, od sledećih pet kriterijuma: centralni (abdominalni) tip gojaznosti (obim struka veći od 101 cm za muškarce i 89 cm za žene), povišene trigliceride (viši od 1,7 mmol/L), snižen dobar holesterol HDL (manje od 1,0 mmol/L kod muškaraca i 1,3 mmol/L kod žena), i povišen krvni pritisak (veći ili jednak 130/85 mmHg), ili povišen nivo glukoze našte (veći ili jednak od 6,1 mmol/L)⁶⁵. Jedna trećina, do jedne polovine svih žena sa PCOS-om, ima metabolički sindrom. Ovo je više nego duplo učestalije u odnosu na opštu populaciju⁶⁶.

Žene koje pate od PCOS-a imaju povećan rizik za razvoj DM2. Insulinska rezistencija doprinosi razvoju DM2 uzrokujući iscrpljivanje beta-ćelija. To dovodi do smanjenog lučenja insulina, koje zatim može dovesti do intolerancije glukoze i DM2⁶⁷. Oko 30–35% žena sa PCOS-om su sa poremećajem tolerancije glukoze i oko 7,5–10% imaju DM2. Ovo predstavlja incidencu dijabetesa od pet do deset puta veću kod žena sa PCOS-om, u odnosu na opštu populaciju⁶³.

2.8. Lečenje PCOS-a

Kada je sindrom policističnih jajnika dijagnostikovano, treba ga trajno nadzirati i lečiti. Lečimo simptome i znake PCOS-a, infertilitet i trudimo se da umanjimo rizike i brojne posledice PCOS-a. Lečenje zavisi od starosnog doba žene, simptoma i znakova kao i želje za reprodukcijom.

Prva mera je smanjenje telesne težine kod gojaznih žena i zdrav način života. Gubitak telesne težine od samo 5% dovodi do: snižavanja vrednosti testosterona u cirkulaciji za 35%, smanjenje insulinske rezistencije za 40% i snižavanja vrednosti LH-a. Rezultati navedenog jesu: veća učestalost redovnih menstrualnih ciklusa, ovulacija, spontane trudnoće i bolji

odgovor na stimulaciju ovulacije⁶⁸. Kada je reč o lečenju akni i hirzutizma kod žena sa PCOS-om, u prvom redu je upotreba niskodoznih oralnih kontraceptiva sa antiandrogenim gestagenom (ciproteron acetat, drospirenon, chlormadinon acetat). Već nakon tri meseca upotrebe oralnih kontraceptiva dolazi do smanjenja akni za 60–85%, a za 6 do 12 meseci hirzutizam se poboljšava za 40–70%. U slučajevima izraženog hirzutizma, odnosno slabog odgovora na oralne hormonske kontraceptive, dodatno se uz njih mogu uključiti i antiandrogeni (spironolakton, finasterid, flutamid). Za terapiju androgene alopecije koristi se dvoprocentni rastvor minoxidila⁶⁹.

Abnormalna koncentracija hormona karakteristična za PCOS, predisponira žene sa ovim poremećajem za nastanak hiperplazije i karcinom endometrijuma. Zbog toga se radi prevencije hiperplazije endometrijuma, kod žena sa PCOS-om upotrebljavaju oralni kontraceptivi ili gestageni. Za žene koje ne žele ili ne smeju koristiti oralne hormonske kontraceptive, lečenje izbora u svrhu zaštite endometrijuma jeste ciklično davanje gestagena. Može se upotrebljavati i intrauterini uložak sa levonorgestrelom.

Kada se radi o tretmanu infertiliteta kod pacijentkinja sa PCOS-om, nekada je klinasta resekcija promovisana od strane Steina i Leventhala bila jedina mogućnost u lečenju policističnih ovarijuma. Konzervativni tretman anovulatornog infertiliteta pacijentkinja sa PCOS-om počeo je primenom antiestrogena, da bi, krajem 1950. i početkom 1960. godine, bili uvedeni egzogeni gonadotropini u terapiju.

PCOS je najčešći uzrok anovulacija (75%). Patofiziološki mehanizam nastanka anovulacija kod žena sa PCOS-om je vrlo složen i nije u potpunosti razjašnjen, ali se zna da veliki broj antralnih folikula, hiperandrogenemija, hiperinsulinemija, kao i abnormalni mehanizmi povratne sprege, doprinose njegovom nastanku. Upravo zbog takve složenosti postoje brojne strategije indukcije ovulacije. Pre započinjanja lečenja anovulacije, potrebno je isključiti druge razloge neplodnosti bračnog para analizom spermograma i ispitivanjem prohodnosti jajovoda. Takođe, indukciju ovulacije ne treba započinjati dok BMI ne bude niži od 30 kg/m²⁷⁰.

2.8.1. Antiestrogen (Klomifen citrat)

U prvoj medikamentoznoj liniji lečenja anovulacija koristi se klomifen citrat (*Clomiphene citrate* – CC). CC je antiestrogen, dovodi do blokiranja estrogenskih receptora na nivou hipotalamusa, što dovodi do aktivacije mehanizma negativne povratne sprege i promene pulsabilnosti GnRH a to dovodi do oslobađanja FSH-a iz hipofize i razvoj folikula i lučenje estradiola⁷¹. Primenjuje se u dozi od 50–150 mg/dan pet dana počev od drugog do

petog dana spontanog ili gestagenima indukovano krvarenja⁷². Započinje se sa dozom od 50 mg/dan, izuzetak su gojazne pacijentkinje gde treba početi sa dozom od 100 mg/dan. Ukoliko se uz tri ciklusa primene CC ne postigne ovulacija, takve žene se smatraju rezistentnim na CC a takvih je 10–30%. Rezistenciju na CC imaju obično gojazne žene, one sa insulinskom rezistencijom, izraženim hiperandrogenizmom i izrazito visokim vrednostima LH-a u cirkulaciji⁷³. Iako je dokazano da kod 70–90% žena CC dovodi do ovulacije, 30–40% žena zatrudni u prva tri meseca, a nakon šest meseci trudnoće se vrlo retko postižu⁷⁴. Razlozi za relativno nisku stopu trudnoće nisu jasni, ali mogu biti u vezi sa visokim nivoima LH, antiestrogenskim efektima klomifena i do negativnog efekta na oocyte^{75,76}. Antiestrogeni efekat CC ima kako na endometrijum, tako i na cervikalnu sluz. Antiestrogeni efekat na cervikalnu sluz primećen je kod 15% bolesnica, a može se prevazići primenom intrauterine inseminacije (IUI). Iako je visoka stopa pobačaja vezana za pacijentkinje kod kojih je CC korišćen za indukciju ovulacije u ranijim studijama, u najnovijim studijama je slična kao u normalnoj populaciji⁷⁷. Procenat multiplih trudnoća je od 6-8%⁷⁸, što je prilično niska stopa u odnosu na indukciju humanim gonadotropinima ali slična u onoj sa niskim dozama FSH protokola^{79,80}. OHSS je retka pojava⁷⁸.

Kod žena rezistentnih na klomifen kao i kod kojih je, uz primenu CC debljina endometrijuma manja od 8 mm, imaju malu mogućnost zatrudnjivanja, i kod njih se predlaže korišćenje inhibitora aromataze ili gonadotropina. Sistematski pregledi i meta-analize su pokazale da CC je zaista najbolja primarna opcija u tretmanu i lečenju žena sa PCOS-om^{81,82}.

Kada anovulatorne žene ovuliraju posle CC-a, ali ne uspevaju da zatrudne posle šest ciklusa, naknadni tretmani su raznovrsni u praksi. Tretman se može nastaviti klomifenom za još šest meseci, ili se može preći na indukciju ovulacije gonadotropinima. ESHRE konsenzus vodič predlaže da terapija žena sa PCOS-om treba da počne sa šest ciklusa CC-a, ali može da se nastavi do 12 ciklusa⁸³. Ova smernica takođe preporučuje da druga linija indukcije ovulacije sa gonadotropinima ne treba da traje duže od šest ovulatornih ciklusa, ali dokazi koji podupiru ovu činjenicu nisu obezbeđeni.

2.8.2. Inhibitori aromataze (Letrozol)

Inhibitori aromataze (IA) su agensi koji potiskuju biosintezu estrogena i smanjuju efekat negativne povratne sprege endogenih estrogena na nivou hipotalamus-hipofiza, što rezultira povećanom sekrecijom FSH-a koji može dovesti do odabira dominantnog folikula i njegovog sazrevanja. Većina žena rezistentna na CC je osetljiva na IA. Prednost Letrozola u

odnosu na CC je izostanak antiestrogenog učinka na endometrijum i cervikalnu sluz. Letrozol u dozi od 2,5–5 mg na dan primenjen od trećeg do sedmog dana kod žena sa PCOS-om rezistentnim na CC dovodi u 75% slučajeva do ovulacije sa stopom trudnoće od 25%⁸⁴. Doza se može povećati u slučaju slabe reakcije na 7,5–10 mg. Upotrebu letrozola treba uvek praktikovati pre upotrebe gonadotropina kod žena rezistentnih na CC.

2.8.3. Oralni antidiijabetici (Metformin)

Metformin je oralni bigvanid koji se koristi u lečenju hiperglikemije. Kod osoba sa normoglikemijom ne uzrokuje hipoglikemiju. Metformin smanjuje rezistenciju na insulin. Kod žena sa PCOS-om metformin smanjuje sintezu insulina na nivou teka ćelija čime doprinosi smanjenju hiperandrogenemije. Upotrebljava se u dozi od 3 x 500 mg na dan, odnosno 2 x 850 mg na dan. Pojedinačne studije su pokazale da upotreba metformina izolovano može vratiti redovnost menstrualnog ciklusa i uzrokovati ovulaciju u 25–95% slučajeva⁸⁵. Varijabilnost u rezultatima među različitim studijama se verovatno odnosi na razlike u dizajnu, doze koja se koristi i trajanju lečenja. Meta-analiza iz 2003. godine Lorda i saradnika koju su činile 13 randomizirane kontrolisane studije, pokazala je da metformin povećava stopu ovulacije 3,88 puta u poređenju sa placebo ili bez tretmana i 4,41 puta kada je administriran u kombinaciji sa klomifenom u odnosu na sam klomifen. Takođe je ustanovljeno signifikantno veća stopa kliničkih trudnoća upotrebom metformina i klomifena u odnosu na upotrebu samo klomifena (OR:4,4; 95% CI:1,96–9,85)⁸⁶.

Randomizovana studija Molla i saradnika objavljena 2007. godine, utvrdila je da je stopa ovulacija znatno niža uz primenu metformina u odnosu na sam CC, i da dodatak metformina CC-u ne povećava stopu ovulacije. Takođe je pokazala da je stopa pobačaja znatno viša, ali ne i statistički značajna kod žena koje su koristile metformin, u odnosu na žene koje su koristile samo CC. Stopa živorođene dece po ciklusu bila je tri puta veća u grupi žena koje su koristile CC u poređenju sa ženama koje su koristile metformin⁸⁷.

Može se zaključiti da je, nakon redukcije telesne težine i promene stila života, CC prva linija lečenja anovulacije kod osoba sa PCOS-om, a da upotreba metformina samog, ili u kombinaciji sa CC-om, još uvek ostaje kontroverzna.

2.8.4. Gonadotropini

Gonadotropini se smatraju drugom linijom tretmana za indukciju ovulacije kod pacijentkinja sa PCOS-om, odnosno u slučajevima rezistencije na klomifen ili neuspjeha. Upotreba gonadotropina za indukciju ovulacije kod žena sa PCOS-om rizičan je metod zbog multifolikularnog razvoja i hiperstimulacije. U cilju postizanja razvoja malog broja folikula, danas se koriste niskodozni *step-up* i *step-down* protokoli. Prvi pristup u lečenju pacijenta sa PCOS-om gonadotropinima je niskodozni step-up protokol, koji primenjuje početnu FSH dozu 75 IU/dan. Lečenje počinje u bilo kom trenutku, pod uslovom da je prisutna niska aktivnost jajnika koja se prati ultrazvukom⁸⁸. Nakon sedam dana doza se može povećati za 37,5 IU na dan. Ista doza se koristi narednih sedam dana. Ako se ne postigne veličina folikula iznad 11 mm doza se povećava svakih 7 dana sve do maksimalne doze od 225 IU/dan. Ukoliko se postigne razvoj folikula iznad 11 mm, ista se doza zadržava sve dok dominantni folikul ne dostigne veličinu ≥ 18 mm, a drugi folikuli budu manji od 14 mm. Tada se administrira hCG, kao trigger ovulacije, iako je kod ovih pacijenata mehanizam pozitivne povratne sprege netaknut⁷⁷.

Rezultati iznešeni u radu koji je obuhvatao 1391 ciklus indukcije ovulacije niskodoznim step-up protokolom, 69% su bili uniovulatorni sa veoma niskom učestalošću OHSS-a (1,4%) i procentom multiplih trudnoća 5,7%⁸⁹. Slični rezultati su dobijeni u jednom centru gde je bilo uključeno 1117 ciklusa⁸⁰. Nije bilo razlike u ishodu između upotrebe humanog menopauzalnog gonadotropina (hMG) i bilo prečišćenog ili rekombinovanog FSH-a^{90,91}.

Drugi pristup lečenju pacijentkinja sa PCOS-om gonadotropinima je step-down protokol. Najnovija modifikacija ovog protokola obuhvata primenu FSH-a u početnoj dozi od 150 IU/dan, i nastavlja u istoj dozi dok dominantni folikul ne dostigne veličinu ≥ 10 mm⁹². Doza se zatim smanjuje za 37,5 IU/dan tri dana, nakon čega sledi umanjenje primenjene doze FSH na 75 IU/dan koja se održava konstantnom do dana hCG administracije. Monofolikularan razvoj je pronađen u 56% ciklusa sa stopom trudnoće od 16% u odnosu na tretirani ciklus i kumulativnom stopom trudnoća 47%⁹³. Kada se uzastopni tretmani CC-om kao prvom linijom izbora, i gonadotropinima kao drugom linijom razmatraju kao kontinuiran proces, dobijena je kumulativna stopa trudnoće od 90% posle 12 meseci, zatim stopa živorođene dece 50% posle 12 meseci, i 71% nakon 24 meseca lečenja⁹⁴.

Ideja o upotrebi GnRH agonista kod bolesnica sa PCOS-om je da suzbije povišene vrednosti bazalnog LH, i tako ublaži negativne uticaje koje visok LH može da ima na ishod

lečenja. Kontroverzni su podaci o stopi trudnoće uporednom primenom GnRH agonista sa gonadotropinima. Brojne studije su pokazale povećan rizik od OHSS-a⁹⁵. Povećana učestalost OHSS-a se pripisuje niskom procentu monofolikularnog razvoja sa upotrebom GnRH agonista. Zbog gore navedenog se GnRH agonisti ne preporučuju kao izbor u tretmanu indukcije ovulacije kod žena sa PCOS-om. Takođe, postoji vrlo malo izveštaja o upotrebi GnRH antagonista u kombinaciji sa gonadotropinima za indukciju ovulacije kod PCOS-a. Obavezne su velike prospektivne studije koje bi ispitale da li GnRH antagonisti u kombinaciji sa FSH imaju prednost nad upotrebom samo FSH.

2.8.5. Laparoskopna elektrokoagulacija strome jajnika (ovarijalni drilling)

Hirurško lečenje anovulacije klinastom resekcijom jajnika kod pacijentkinja sa PCOS-om je napušteno, kako zbog ozbiljnih neželjenih efekata, tako i zbog značajnog gubitka ovarijalnog tkiva. Napredak laparoskopne tehnike je ponovo rasplamsao ideju o hirurškoj indukciji ovulacije. Laparoskopna elektrokoagulacija strome jajnika (*Laparoscopic ovarian drilling – LOD*), uveden od strane Gjønnaess (1984), obnavlja ovulaciju kod 92% pacijentkinja sa stopom trudnoće od 69%. Ovarijalni drilling se vrši monopolarnom, bipolarnom elektrodom ili energijom lasera, mada postoje značajna odstupanja u tehnikama koje se koriste. Pored uobičajenog laparoskopnog pristupa, postupak je moguće izvesti i transvaginalnom hidrolaparoskopijom⁹⁶.

Mehanizam dejstva LOD je nejasan, ali izgleda da destrukcija androgenprodukujuće strome jajnika igra ključnu ulogu.



Slika 7. Laparoskopni ovarijalni drilling za PCOS.

Preuzeto:(<http://www.indiamart.com/sevana-hospital/laposcopic-surgeries.html>)

Do sada, mnoge studije su pokazale da LOD može da predstavlja alternativni tretman za klomifen rezistentne PCOS pacijente. Međutim, procenat pacijenata veći od 43% ne može spontano da ovulira posle LOD⁹⁷. Jedna follow-up studija koja je trajala devet godina pokazala je da jedna trećina pacijentkinja ima redovne menstrualne cikluse nakon LOD⁹⁸.

Meta-analiza Farquhar i saradnika iz 2001. godine koja se sastoji od šest randomiziranih kontrolisanih studija, pokazala je da je procenat trudnoća 6–12 meseci od LOD u odnosu na 3–6 ciklusa ovulacije indukovane gonadotropinima, bio sličan. Procenat višestrukih trudnoća je manji nakon LOD-a u poređenju sa gonadotropinima, dok se procenat pobačaja nije razlikovao¹⁰⁰.

LOD, osim uobičajenih rizika koje nosi laparoskopija i opšta anestezija, može biti povezan sa stvaranjem periadneksalnih adhezija kod 19–43% pacijentkinja¹⁰¹. Trenutni dokazi, iako su terapijski efekti LOD dokumentovani, ne opravdavaju njegovu upotrebu kao prvu liniju tretmana kod klomifen rezistentnih PCOS pacijentkinja¹⁰².

2.8.6. Vantelesno oplodjenje (VTO)

Vantelesno oplodjenje ili *in vitro* fertilizacija (IVF) se ne smatra metodom izbora u lečenju pacijentkinja sa PCOS-om, već alternativnim tretmanom infertilnih PCOS pacijentkinja rezistentnih na ostale *in vivo* metode. VTO je poslednji metod izbora lečenja. Dve glavne indikacije za primenu VTO metode lečenja infertiliteta kod PCOS pacijentkinja su:

- pacijentkinje sa dugačkim stažom infertiliteta rezistentne na ostale *in vivo* metode lečenja^{103,104};
- koegzistencija drugog faktora infertiliteta, naročito tubarnog faktora¹⁰⁴.

In vitro fertilizacijom dobija se veći broj jajnih ćelija kod žena sa PCOS-om u odnosu na one koje nemaju ovaj sindrom. Pretpostavlja se da je stopa fertilizacije oocita manja kod žena sa PCOS-om, kao i da je veći broj nezrelih jajnih ćelija, ali da je broj embriona za embriotransfer (ET) po ciklusu jednak kao u žena koje nemaju PCOS. Još uvek nije pronađen optimalan protokol za bolesnice sa PCOS-om. Dugi niz godina dugi protokol sa GnRH agonistima bio je metoda izbora u pacijentkinja sa PCOS-om. U poslednje vreme postalo je jasno da primena antagonista GnRH zahteva kraću stimulaciju gonadotropinima, kao i da ređe dovodi do nastanka sindroma ovarijalne hiperstimulacije.

2.9. Ovarijalni hiperstimulacioni sindrom (OHSS)

Sindrom hiperstimulacije jajnika je jatrogena komplikacija superovulacije ovarijalne stimulacije. Javlja se u dvema glavnim kliničkim formama: kao rani i kasni OHSS. Rani OHSS se javlja nekoliko dana (3–7 dana, najkasnije 9 dana) posle indukcije folikularne ruptуре davanjem hCG-a, ili nakon aspiracije jajnih ćelija, gde je rast folikula bio stimulisan korišćenjem klomifen citrata ili gonadotropina, bilo samostalno ili u kombinaciji sa agonistima ili antagonistima GnRH. Kasni OHSS, obično je teži i zavisi od endogenog hCG-a proizvedenog implantaciom embriona. Posebno je izražen kod višeplođnih trudnoća. OHSS je drugi na listi po važnosti i incidenci neželjeni efekat, iza multiplih trudnoća, povezan sa terapijom infertiliteta^{105,106}.

U početnoj formi OHSS-a dolazi do povećanja veličine jajnika, što je praćeno abdominalnom nelagodnošću. Uznapredovanjem, jajnici postaju cistični i to abdominalno rastezanje praćeno je bolom, mučninom, povraćanjem i prolivima. Sve ovo može biti praćeno formiranjem slobodne ascitne tečnosti. Ona se nekad može verifikovati jedino ultrazvukom dok kod težih oblika OHSS-a je moguće klinički identifikovati. Ovaj ekstravaskularni eksudat bogat proteinima, nakuplja se u peritoneumu, pleuri i u perikardnoj šupljini. Usled povećane kapilarne propustljivosti i izlaska tečnosti u ekstravaskularni prostor, dolazi do hemokoncentracije, slabije prokrvljenosti organa sa oligurijom, oštećenja jetre i bubrega, poremećaja zgrušavanja krvi sa tromboembolijom kao krajnjom komplikacijom, a ponekad i fatalnim ishodom uprkos tretmanu^{107,108}.

Obzirom na naše znanje o etiologiji OHSS-a, naše odluke moramo bazirati na preventivnim strategijama i identifikaciji faktora koji su povezani sa OHSS-om. Srećom, prevalenca teže forme OHSS-a je mala 0,5-5%. Ipak, pošto je jatrogena komplikacija sa potencijalno fatalnim ishodom, sindrom predstavlja ozbiljan problem za specijaliste koji se bave infertilitetom, i dovodi do dva važna klinička pitanja:

1. Da li je moguće identifikovati potencijalo rizične pacijente?
2. Koji preventivni metod treba primeniti kada se javi preterani odgovor jajnika?

Prilikom razmatranja isključivo pacijentkinje koje su lečene metodom VTO učestalost OHSS-a je $3\pm 6\%$ za umerenu formu, $0,1\pm 2\%$ za teške forme^{109,110,111}. Blage forme OHSS-a koje imaju malo kliničke relevantnosti, čine oko $20\pm 33\%$ ciklusa VTO^{112,113}.

Faktori rizika se mogu podeliti na primarne i sekundarne. Primarni se prepoznaju pre započetog lečenja i tu spadaju: godine, BMI, PCOS, ranije hiperstimulacije, broj antralnih folikula, AMH. Sekundarni faktori rizika postaju uočljivi tokom stimulacije jajnika kada paci-

jenti bez poznatog predisponirajućeg faktora dožive preteranu reakciju na lečenje. U sekundarne faktore rizika ubrajaju se: nivo serumskog E2, broj stimuliranih folikula i aspiriranih jajnih ćelija, protokoli indukcije ovulacije ili ovarijalne stimulacije, egzogeni i endogeni hCG.

U većini studija objavljeno je da su žene koje pate od OHSS-a, bile signifikantno mlađe. Objašnjenje je da su jajnici mlađih žena mnogo osetljiviji na gonadotropine jer oni imaju veći broj gonadotropnih receptora, kao i veći broj folikula koji su u stanju da odgovore na gonadotropine. Samo jedna grupa autora, Navot i saradnici; 1988. godine, sa 54 slučajeva OHSS-a, ima opisanu pozitivnu korelaciju između niske telesne mase i OHSS-a, dok ostale studije nisu pokazale korelaciju između BMI-a i sklonosti za razvoj OHSS-a¹¹⁴. U jednoj Belgijskoj studiji od 128 žena koje su imale OHSS, 37% ih je bilo sa policističnim jajnicima, a 15% u kontrolnoj grupi koja je brojala 256 žena¹¹⁵. Objašnjenje može biti da se u PCOS proizvodi tri puta više folikula i oocita nego u normoovulatornim pacijentkinjama kada su stimulirane istim protokolima¹¹⁶.

Povećana ekspresija vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) u hipertekotičnoj stromi jajnika žena sa PCOS-om može biti razlog za povećan rizik nastanka OHSS-a¹¹⁷. Uloga povišenog nivoa E2 u OHSS nije potvrđena, međutim niži nivo E2 pomaže u prevenciji OHSS-a. Nivo E2 iznad kojeg postoji znatan rizik OHSS, široko varira zavisno od istraživanja. Većina studija odobrilo je E2 od 3000 pg/mL kao bezbednu vrednost za primenu hCG-a^{118,119}.

2.9.1. Klasifikacija OHSS-a

Prvu klasifikaciju sindroma hiperstimulacije jajnika koja obuhvata i laboratorijske i kliničke nalaze, dao je Rabau i saradnici, 1967. godine¹²⁰. Kasnije Schenker i Veinstein, 1978. godine reorganizuju i modifikuju klasifikaciju u tri glavne kliničke kategorije i šest razreda, prema ozbiljnosti simptome, znakova i laboratorijskih nalaza¹²¹. Nova klasifikacija od tri kategorije i pet stepena težine uvedena je 1989. godine od strane Golana i saradnika, i ona je kasnije modifikovana daljim deljenjem teških formi u dve podgrupe (Navot i saradnici, 1992.). Najnovija klasifikacija sa daljim modifikacijama uvedena je 1999. godine (Rizk i Aboulghar, 1999.). Prvi cilj klasifikacija bio je da se uporedi učestalost OHSS-a u različitim stepenima težine, a to je od suštinskog značaja za procenu i poređenje efikasnosti različitih preventivnih mera za OHSS. Drugi cilj je bio planiranje i standardizacija smernica za ponašanje i tretman svakog stepena OHSS-a.

U klasifikaciji koju je dao Golan 1989. godine mučnina, povraćanje, proliv i abdominalna distenzija spadaju u blagi OHSS. Ultrazvučna verifikacija jajnika veličine 5–12 cm,

takođe je uključena u blagi oblik ovog sindroma. Umereni oblik OHSS-a, uz prethodno opisane znake blagog OHSS-a ima pridodat ultrazvučni nalaz ascita. Dok je teški oblik OHSS-a podeljen u dva stepena, kod lakšeg stepena dolazi do povećanja količine ascitne tečnosti, otežanog disanja i hidrotoraksa. Teži stepen obuhvata hemokoncentraciju, povećanu viskoznost krvi, poremećaj koagulacije i smanjenu bubrežnu perfuziju¹¹².

Tabela 3. Klasifikacija ovarijalnog hiperstimulacionog sindroma

	Blagi	Umereni	Teški	
Golan i drugi	Gradus 1: abdominalna distenzija i nelagodnost Gradus 2: gradus 1 + mučnina, povraćanje i/ili dijareja, uvećani ovarijumi 5±12 cm	Gradus 3: gradus 2 + ultrazvučno potvrđeno prisustvo ascitne tečnosti	Gradus 4: gradus 3 + klinički nalaz ascita i/ili hidrotoraks i otežano disanje	Gradus 5: gradus 4 + hemokoncentracija, povećana viskoznost krvi, poremećaj koagulacije i snižena renalna perfuzija
Navot i ostali			Teški OHSS: varijabilno uvećan ovarijum; masivni ascites ± hidrotoraks; Hct >45%; WBC>15 000; oligurija; kreatinin 1.0±1.5; klirens kreatinina >50 ml/min; disfunkcija jetre; generalizovani edem	Kritični OHSS: varijabilno uvećan ovarijum; tenzioni ascites ± hidrotoraks; Hct >55%; WBC>25 000; oligurija; kreatinine >1.6; klirens kreatinina <50 ml/min; smanjenje funkcije bubrega; tromboembolizam; ARDS
Rizik i Aboulghar		Nelagodnost, bol, mučnina, distenzija, ultrazvučni nalaz ascitesa i uvećani ovarijumi, normalni hematološki i biološki status	Gradus A: Dispneja, oligurija, mučnina, povraćanje, diarrhoea, abdominalna bol, klinički nalaz ascitesa, izražena distenzija abdomena ili hidrotoraks, UZ uvećani ovarijumi i, izraženi ascites, uredan biohemijski nalaz	Gradus B: Gradus A + masivni ascites, jako uvećano ovarijumi, teška dispneja i izražena oligurija, ili uvećan hematokrit, povećane vrednosti serumskog kreatinina i disfunkcija jetre Gradus C: Komplikacije kao što su respiratorni distres sindrom, disfunkcija bubrega i venska tromboza

ARDS = akutni respiratorni distres sindrom; Hct = hematokrit; UZ = ultrazvuk; WBC = crvena krvna zrnca.

Preuzeto: Aboulghar MA, Mansour RT. Ovarian hyperstimulation syndrome: classifications and critical analysis of preventive measures. Hum Reprod Update. 2003;9(3):275-89.

Tokom ranih devedesetih godina prošlog veka uvedena je modifikacija prethodne klasifikacije, i to samo u delu teškog OHSS-a, na tešku i po život opasnu podgrupu (Navot i saradnici, 1992). Pored toga, generalizovani edem (anasarka) i disfunkcija jetre su dodati kao znaci teškog OHSS-a. Takođe, Navot predlaže da se kod ovih pacijentkinja više oslanjamo na kliničku sliku i laboratorijske parametre nego na veličinu jajnika¹²².

Poslednja klasifikacija koju su dali Rizk i Aboulghar, 1999. godine, razlikuje se od prethodnih u nekoliko aspekta. Blagi stepen je izostavljen iz klasifikacije jer blage forme se mogu desiti u većini pacijentkinja nakon stimulacije jajnika, i one ne zahtevaju poseban tretman. Umereni stadijum ima najviše simptoma: bol, napetost trbuha, ultrazvučno utvrđen ascit uz uredne hematološke i biohemijske nalaze. Teški oblik sindroma podeljen je prema težini na A, B i C podgrupe. U podgrupi A, osim bolova u truhu, nalazimo otežano disanje, mučninu, povraćanje, oliguriju, kao i kliničke znakove ascita i hidrotoraksa. Biohemijski nalazi su još uvek u referentnim vrednostima. U podgrupi B dodatno se nalaze: povišen hematokrit, kreatinin i jetreni enzimi. U ovom stadijumu bolesnicu treba hospitalizovati. U podgrupi C, stanje se dodatno komplikuje respiratornim distres sindromom, smanjenjem bubrežne funkcije i venskim trombozama. Ovakve bolesnice treba lečiti u jedinicama intenzivne nege¹²³.

2.9.2. Prevencija OHSS-a

Potpuna zaštita od OHSS-a nije moguća, ali se ranim otkrivanjem faktora rizika i pažljivim kliničkim vođenjem stimulacije jajnika, učestalost OHSS-a može značajno smanjiti. Korišćenje ultrazvuka i serumskog nivoa E2 za monitoring ovarijalne stimulacije se smatra „zlatnim standardom”. Uprkos tome što su E2 i ultrazvučni monitoring neophodni, i što se redovno primenjuju, oni su donekle insuficijentni, jer većina IVF centara i dalje izveštava o pojavi teških oblika OHSS-a¹¹⁵. Strogi monitoring, međutim, dozvoljava primenu niza preventivnih mera, kada očekujemo ili imamo prenaplašeni odgovor jajnika. Preventivne strategije se mogu podeliti u primarne i sekundarne. Primarna prevencija obuhvata prepoznavanje primarnih faktora rizika i prilagođavanje protokla stimulacije. Na osnovu primarnih faktora rizika, pacijentkinje treba klasifikovati na one kod kojih očekujemo slab (*poor responders*), normalan i pojačan (*high responders*) odgovor jajnika. Tako ćemo „poor respondere” tretirati protokolima koji su povezani sa upošljavanjem većeg folikularnog kohorta. Nasuprot tome, kod „high respondera” primenićemo protokole koji su povezani sa slabijim odgovorom. Rezime aktuelnih kliničkih mera prevencije OHSS i najnoviji dokazi o preventivnoj strategiji OHSS-a, obuhvataju primarne i sekundarne preventivne mere.

Mere **primarne prevencije** obuhvataju:

1. *Smanjenje izloženosti gonadotropinima* tj. smanjenje ukupne doze gonadotropina (IU) u ciklusu. Pošto je PCOS poznati faktor rizika za OHSS-a, razvijeni su brojni nisko-dozni protokoli koji su namenjeni ovoj grupi pacijentkinja. Cilj ovih protokola je da stimulišu jajnike bez prekoračenja FSH praga, čime se postiže razvoj jednog dominantnog folikula, a ne više folikula⁸⁹.
2. *Primenu protokola sa GnRH antagonistima*: Sistematskim pregledom Kohranove baze podataka 2006. godine, pokazalo je da je učestalost teškog OHSS-a značajno niža u protokolu sa antagonistima GnRH nego u protokolima sa agonistima GnRH (relative risk [RR], 0,61; 95% confidence interval [CI], 0,42–0,89; p=0,01) i da su sekundarne mere prevencije, kao što su privremeni prekid stimulacije i odustajanje od stimulacije, češće korišćene kod agonista (OR, 0,44; 95% CI 0,21–0,93; p=0,03)¹²⁴. Takođe, jedna meta-analiza koja je rađena od strane Kolibianakisa i saradnika utvrdila je da je broj hospitalizovanih slučajeva OHSS-a bio znatno niži kod antagonista u odnosu na agoniste (OR, 0,46; 95% CI, 0,26–0,82; p=0,01)¹²⁵.
3. *Upotrebu antidijabetika*: Meta-analiza sačinjena od osam randomizovanih kontrolisanih studija o koadministraciji metformina tokom indukcije ovulacije gonadotropinima, ili tokom IVF-a kod žena sa PCOS-om, pokazala je malo koristi u smislu bolje ovulacije ili kliničkog ishoda u ovoj populaciji, ali je postignut signifikantno pozitivan efekat na učestalost OHSS-a (OR, 0,21; 95% CI, 0,11–0,41; p<0,00001) kod pet studija koje su navele OHSS kao ishod mera (n = 426)¹²⁶.

Mere **sekundarne prevencije** primenjuju se tokom stimulacije jajnika i obuhvataju:

1. *Privremeni prekid stimulacije (coasting)* podrazumeva prekid stimulacije gonadotropinima od jednog do nekoliko dana i odlaganje hCG inekcije kad nivo E2 padne na manje od 3000 pg/ml. Delvigne je 2002. godine, sistematskim pregledom 12 studija sa 493 pacijentkinje, utvrdio da coasting ne eliminiše rizik od OHSS-a kod pacijenata sa visokim rizikom, ali da može smaniti rizik od nastanka OHSS-a i težinu stanja¹²⁷. Iako su mnogi autori zaključili da nema dovoljno dokaza da je coasting efikasna strategija za sprečavanje OHSS-a, ipak je široko prihvaćena kao prva linija intervencije za smanjenje rizika i ozbiljnosti¹²⁸.
2. *Niža doza hCG-a za završno sazrevanje oocita* pokazala se kao korisna preventivna mera. Pošto je već dobro poznato da je hCG faktor rizika za OHSS, brojni istraživači ocenjivali su vrednost upotrebe niže doze hCG-a za aktiviranje ovulacije. U poređenju

sa standardnom dozom 10.000 IU, doza od 5.000 IU se uspešno koristi za pokretanje ovulacije, a da ne ugrožava klinički ishod^{129,130}.

Rad objavljen 2006. godine prijavio je slične stope trudnoće, ali i značajno manju pojavu ranog i teškog oblika OHSS-a u 792 ciklusa kod kojih je korišćen malo-dozni hCG protokol, u poređenju sa 1789 ciklusa kod kojih je korišćena uobičajena doza od 10.000 IU¹³¹. Treba napomenuti da većina podataka o efikasnosti ove strategije u smanjenju stope OHSS-a dolazi iz malih, nekontrolisanih i/ili retrospektivnih studija, tako da dokazi koji sugerišu da je rizik od OHSS-a niži posle smanjene doze hCG-a, zahtevaju podršku budućih velikih randomizovanih kontrolisanih studija.

3. *Krioprezervacija svih embriona*: Zamrzavanje svih embriona sprečava pojavu kasnog, ali ne i ranog oblika OHSS-a¹³².
4. *Odustajanje od stimulacije (cancelling)* je jedini garantovani metod za prevenciju ranog OHSS-a¹²¹. Uprkos uspehu, većina lekara nerado koristi otkazivanje ciklusa, posebno kod VTO-a, gde finansijski teret lečenja i psihološko uznemirenje pacijentkinja može biti značajno.
5. *GnRH agonisti umesto hCG-a* za završno sazrevanje oocita koriste se u GnRH antagonistima stimulisanim ciklusima. Humani horionski gonadotropin je korišćen uspešno preko 60 godina za indukciju ovulacije. Međutim, relativno dug poluživot hCG-a u serumu ima produžen luteotropni efekat, kao i višestruki korpus lutealni razvoj. Takođe, on podiže nivo E2 i P tokom lutealne faze, a samim tim povećava i rizik od OHSS-a^{133,134}. Ovaj rizik je sličan i za urinarni i rekombinovani hCG¹³⁵. Dokazi studija manjeg obima sugerišu da ovaj pristup značajno smanjuje, ili čak eliminiše pojavu OHSS-a u populaciji pacijenata sa visokim rizikom za nastanak OHSS-a. Međutim, kada je u pitanju reproduktivni ishod u tim istim studijama, rezultati su kontradiktorni. Dok jedne prijavljuju normalan reproduktivni ishod, druge prijavljuju razočaravajuće nisku stopu trudnoća u toku, i visoku stopu gubitaka u ranoj trudnoći^{136,137}. Zaključak je da upotreba GnRH agonista za završno sazrevanje oocita u GnRH antagonistima stimulisanim ciklusima daje obećavajuće rezultate kod pacijenata sa visokim rizikom za razvoj OHSS-a.

Druge moguće sekundarne mere prevencije obuhvataju davanje antagonista tokom folikularne faze u cilju sprečavanja sindroma hiperstimulacije i smanjenja nivoa E2 već nakon 24 do 48 sati od njihovog davanja, a bez uticaja na ishod lečenja¹³⁸. Ranije su se albumini često

koristili profilaktično kod teškog oblika hiperstimulacije. Nažalost, nove prospektivne randomizirane studije nisu potvrdile uspešnost albumina u prevenciji teškog oblika bolesti¹³⁹.

Takođe je moguće uraditi ranu jednostranu aspiraciju folikula 10 do 24 sata nakon davanja hCG-a. Aspiracija granulosa ćelija iz jednog jajnika je predložena kao sredstvo izazivanja intraovarijalnog krvarenja, što ograničava proizvodnju OHSS medijatora, omogućavajući kontralateralni razvoj jajnika¹⁴⁰. Zbog agresivnosti metode i relativne delotvornosti postoje kontradiktorna iskustva, jer se aspiracijom folikula sa jednog jajnika ne mogu u potpunosti sprečiti teži oblici bolesti¹⁴¹.

2.9.3. Lečenje pacijentkinja sa OHSS-om

U slučajevima izostanka povoljnog učinka ili neuspešnosti primarnih i sekundarnih preventivnih mera, a pri nastupu simptoma hiperstimulacije, primenjuje se lečenje. Blagi OHSS ne zahteva nikakvu specifičnu terapiju. Većina pacijenata se potpuno oporavi u roku od nedelju dana. Ambulantni nadzor je ipak obavezan da detektuje slučajeve koji mogu da napreduju ka umerenom ili teškom OHSS-u. Pacijentkinju treba savetovati da konsultuje ginekologa u slučaju pogoršanja simptoma, odnosno ako postoji gubitak apetita, povećanje telesne težine ili nadutosti. Ako su jajnici uvećani, pacijentkinju treba savetovati da izbegava težu fizičku aktivnost jer ona može dovesti do torzije jajnika. Stepen abdominalne nelagodnosti može zahtevati upotrebu analgetika. Odmor i adekvatan unos tečnosti, minimum 1 L dnevno (po definiciji „koliko se unese, toliko mora da izađe”) je oslonac lečenja kod pacijenata sa umerenim OHSS-om. Fizičku aktivnost i sport treba izbegavati, ali i strogo mirovanje nije dobro jer povećava rizik od venskog tromboembolizma. Nadzor nad pacijentkinjom treba vršiti na svaka 2–3 dana ambulantno, imajući u vidu da nakon ET-a i pojave trudnoće, stanje se može iznenada pogoršati i zahtevati hospitalizaciju. Teški oblik OHSS-a se mora smatrati potencijalno fatalnom komplikacijom i zahteva odmah terapiju, kao i pažljivo praćenje.

Hematokrit je dragocen parametar za procenu ozbiljnosti OHSS-a. Hospitalizacija je obavezna kada hematokrit dostigne vrednost od 45%. Svakog dana treba kontrolisati telesnu težinu, obim trbuha, unos tečnosti i diurezu, broj leukocita (povišeni leukociti su znak tromboembolizma), koncentraciju hemoglobina, elektrolite, klirens kreatinina, ureu, kreatinin, C reaktivni protein, koagulacioni skrining i D-dimer. Jednom nedeljno treba uraditi testove funkcije jetre i bubrega, rendgenografiju grudnog koša (zbog moguće efuzije pleure) i elektrokardiogram ili ultrazvuk srca (zbog moguće efuzije perikarda).

Rukovođenje pacijentima sa OHSS-om podrazumeva održavanje hemodinamske cirkulacije i sprečavanje hemokoncentracije. Dobro je poznato da hipovolemija dovodi do povećanja intraabdominalnog pritiska (IAP) i predisponira pacijenta za disfunkciju mnogih sistema i organa. Početna hidratacija podrazumema i.v. primenu 1000 ml normalno slanog rastvora, kako bi se održala odgovarajuća diureza, i postigla normalizacija hemokoncentracije¹⁴². Ako je diureza adekvatna i hemokoncentracija se normalizuje, 5% dekstroza ili glukoza, kao i normalni fiziološki rastvor, održava se po stopi od 125–150 ml na sat. Ako je diureza nedovoljna, manja od 20 ml na sat, a hematokrit se ne koriguje u pravcu euvolemije, prestaje i.v. primena kristaloida i počinje primena 25% albumina u dozi od 50 gr na svaka 4 sata, ali ne duže od 12 sati¹⁴³. Terapija diureticima je obično kontraindikovana kod pacijenata sa hemokoncentracijom. Nakon što pacijent bude hemodinamski stabilan i hemokoncentracija se normalizuje (<38%), moguća je primena diuretika (Furosemid 20 mg i.v.) u kombinaciji sa koloidima kako bi se mobilisala tečnost iz trećeg prostora. Čim intravaskularni volumen i elektrolitne promene budu ispravljene, a pacijent ima adekvatnu diurezu, može se prevesti na oralni unos. Hipertoni fiziološki rastvor se koristi da bi se povukla intracelularna tečnost i povećala zapremina plazme. Takođe, hipertoni slani rastvor može da smanji gubitak tečnosti tokom stanja povišene mikrovaskularne propustljivosti¹⁴⁴.

Dopamin se koristi u oliguričnih pacijenata sa teškim OHSS-om, što rezultira poboljšanjem renalne funkcije¹⁴⁵. Dopamin dovodi do povećanja protoka krvi kroz bubrege i glomerularne filtracije. Ovo se postiže putem stimulacije dopaminergičkih receptora. Međutim, agonisti dopaminskih D2 receptora, kabergolin, izgleda da su mnogo efikasniji i bolje se tolerišu od dopamina.

Otkriveno je da dopamin ili agonisti dopaminskih D2 receptora, primenjeni u visokim dozama inhibiraju vezivanje VEGF za VEGFR-2 na nivou ćelija endotela. Kao rezultat dobijamo smanjenu angiogenezu i vaskularnu propustljivost¹⁴⁶. Alvarez i saradnici su uradili pilot studiju kod pacijenata sa rizikom od OHSS-a koji su oralno dobijali kabergolin 0,5 mg dnevno, od dana primene hCG-a narednih 9 dana. Primetili su da su ascit, hemokoncentracija, vaskularna hiperpermeabilnost i OHSS značajno smanjeni¹⁴⁷.

Oni su takođe pokazali da tretman kabergolinom ne utiče na implantaciju i trudnoću¹⁴⁸. Sistematski pregled i meta-analiza četiri randomiziranih studija, upoređujući profilaktički efekat upotrebe agonista dopamina, kabergolina, sa onim bez tretmana u IVF ciklusima, pokazali su da profilaktički tretman sa kabergolinom smanjuje incidencu, ali ne i ozbiljnost OHSS-a, bez uticaja na ishod trudnoće¹⁴⁹.

Kako je tromboembolijska komplikacija potencijalno opasna po život, primenu trombopofilakse treba razmotriti za pacijente koji razvijaju umereni ili teški OHSS. Antikoagulantno lečenje heparinom niske molekularne težine primenjuje se u slučajevima utvrđene hiperkoagulabilnosti i klinički evidentiranih tromboembolijskih komplikacija. Takvi poremećaji nastaju zbog imobilizacije ili kompresije krvnih sudova karlice usled pritiska izazvanim povećanjem jajnika ili ascita, hiperestrogenemije ili zbog trudnoće¹⁴².

Paracenteza je još jedan metod koji se koristi u upravljanju OHSS-om, u cilju da se spreči progresija težine bolesti. Međutim, paracenteza nije indikovana kod svakog pacijenta sa OHSS-om. Indikacije za paracentezom se zasnivaju na simptomackim komplikacijama dispneje, abdominalne distenzije, bolovima u stomaku i oliguriji. Odmah nakon evakuacije slobodne tečnosti iz trbuha opažaju se karakteristične hemodinamske promene kao što su: smanjenje IAP, smanjenje venske staze i poboljšanje perfuzije bubrega¹⁵⁰.

2.10. VTO tretman i primena kod pacijentkinja sa PCOS-om

Louise Joy Brown, prva beba začeta metodom vantelesnog oplodjenja, rođena je 25. jula 1978. godine u opštoj bolnici Oldham u Engleskoj. Izumitelji ovog postupka su ginekolog dr Patrick Steptoe i dr Robert Edwards za šta je 2010. godine dr Edwards dobio Nobelovu nagradu. Od tada, punih 38 godina korišćenje VTO i ostalih metoda asistiranе reproduktivne tehnologije stalno beleži porast. Procena je da se između 2 i 5% novorođenčadi godišnje rodi nakon primene neke od metoda asistiranе reproduktivne tehnologije. U anglosaksonskoj terminologiji *assisted reproductive technologies* (ART) obuhvata sve postupke i lečenja kojima se izvan tela obavlja obrada gameta, oplodnja i kultivacija zametaka. Najčešće upotrebljavane metode ART-a jesu inseminacija i VTO. Godišnje se u svetu obavi oko milion IVF postupaka i rodi 250–300 hiljada dece. Godišnji porast ART postupaka u svetu je 8–10%.

Prve pacijentkinje podvrgnute VTO imale su tubarni faktor neplodnosti. Indikacije su se vremenom proširile na muški, imunološki sterilitet, endometrioza i nepoznati uzrok neplodnosti. Metoda VTO je kompleksna i sastoji se iz nekoliko koraka¹⁵¹.

Kontrolisana ovarijalna hiperstimulacija ima za cilj dobijanje što većeg broja folikula, odnosno zrelih oocita. Prva VTO sprovedena je u spontanom ciklusu, merenjem vrednosti LH-a u trosatnim intervalima i određivanjem pogodnog trenutka za aspiraciju oocite. Niska stopa uspeha u spontanim ciklusima (svega 6%), dovela je do upotrebe klomifen citrata i humanog menopauzalnog gonadotropina koji omogućavaju razvoj većeg broja folikula¹⁵². Kasnih osamdesetih godina, prošlog veka, uvedeni su GnRH agonisti kao sredstvo postizanja

hiposenzitizacije („down” regulacije) hipofize, u cilju sprečavanja prevremene ovulacije koja je bila odgovorna za približno 15% prekinutih ciklusa¹⁵³. Pored hMG-a, u stimulaciji se od sredine devedesetih koristi i rekombinantni FSH (rFSH), naročito kod pacijentkinja sa sindromom policističnih jajnika. U kratkom protokolu stimulacije, sa GnRH agonistima kreće se drugog ili trećeg dana menstrualnog ciklusa a sa gonadotropinima dan ili dva dana kasnije. Ovaj takozvani „flare up” protokol zbog početnog stimulirajućeg efekta GnRH agonista koristan je kod pacijentkinja sa slabim odgovorom na stimulaciju. U dugom protokolu, sa GnRH agonistima kreće se u lutealnoj fazi prethodnog menstrualnog ciklusa do postizanja prolazne hipofizne supresije, koja se potvrđuje vrednostima estradiola iz krvi manjim od 20 pg/ml i LH-om manjim od 2 IU/L. Nakon ove potvrde hipofizne supresije, kreće se sa stimulacijom. Zbog izostanka „flare up” efekta ovaj protokol zahteva veću količinu gonadotropina za stimulaciju. U cilju izbegavanja početnog „flare up” efekta mogu se koristiti i antagonisti GnRH. Antagonisti deluju kompetitivnim vezivanjem niza receptora i sprečavanjem endogenog GnRH da stimuliše gonadotropne ćelije. Oni, takođe, dovode do desenzitizacije i *down* regulacije receptora za GnRH. Za razliku od agonista, koje treba primenjivati 10–14 dana da bi se postigao željeni učinak, antagonisti deluju već nakon 4–8 sati, postizujući isti efekat kao i agonisti. U ovom protokolu od drugog ili trećeg dana ciklusa primenjuju se gonadotropini a od 5. ili 6. dana stimulacije gonadotropinima uvodi se primena antagonista¹⁵⁴. Doze primenjenih gonadotropina određuju se individualno, na osnovu godina starosti, BMI-a, bazalne vrednosti FSH-a i broja antralnih folikula, zatim na osnovu vrste patologije koja je razlog infertiliteta (PCOS, endometrioza), kao i toga da li je u pitanju prvi tretman, ili je pacijentkinja već bila podvrgnuta VTO-u. Na isti način određuje se i protokol stimulacije¹⁵⁵.

Za praćenje ovarijalnog odgovora na stimulaciju koristi se merenje serumskog estradiola i ultrazvučni prikaz rastućih folikula. Cilj ovarijalne stimulacije je postizanje rasta vodećeg folikula do 18 mm zajedno sa porastom vrednosti estradiola u serumu od 200 pg/ml po svakom folikulu promera 14 mm i više. Po postizanju rasta dominantnog folikula ≥ 18 mm sa prateća dva folikula ≥ 16 mm, ili kada tri folikula dostignu veličinu ≥ 17 mm uz odgovarajući porast serumskog estradiola, u cilju nastavka prve mejotičke deobe oocita jednokratno se intramuskularno ubrizgava 5.000 ili 10.000 IU hCG-a. Kod pacijentkinja sa ovarijalnom hiperstimulacijom (više od 25 folikula ili vrednosti estradiola u serumu veće od 4000 pg/ml) odlaže se primena hCG-a¹⁵⁶.

Sledeća faza je punkcija ovarijuma i aspiracija jajnih ćelija. Davanje hCG-a omogućava planiranje aspiracije, s obzirom da standardni vremenski razmak između ova dva koraka

iznosi 34–36 sati. Smatra se da je ovo vreme dovoljno za adekvatno sazrevanje oocita. Sam zahvat se izvodi u kratkotrajnoj intravenskoj anesteziji, i podrazumeva transvaginalnu punkciju ovarijuma i aspiraciju oocita pod kontrolom ultrazvuka. Komplikacije prilikom aspiracije su veoma retke i podrazumevaju intraabdominalno krvarenje, povredu creva i mokraćne bešike¹⁵⁷. Identifikacija oocite u folikularnoj tečnosti obavlja se stereozum mikroskopom. Stepem zrelosti procenjuje se na osnovu morfoloških karakteristika kumulusa ooforusa i korone radijate. Zrela jajna ćelija koja se nalazi u metafazi II mejotičke deobe okružena je kumulusom ooforusom veličine 0,5–0,8 cm, dok su ćelije korone radijate zrakasto raspoređene oko jajne ćelije. Otprilike 95% zrelih jajnih ćelija ima izbačeno prvo polarno telašće pa su i fiziološki zrele za oplodnju. Spermatozoide treba dodati jajnim ćelijama što pre nakon aspiracije, kako bi usledila oplodnja. Naime, oocite imaju veću šansu da se uspešno fertilizuju ako inseminacija usledi 3–4 sata nakon aspiracije. Nakon osnovne analize sperme, a na osnovu broja i pokretljivosti spermatozoida, donosi se odluka o metodi pripreme sperme, koja za cilj ima odvajanje spermatozoida od semene tečnosti, a zatim i izolovanje samo pokretnih spermatozoida. Najčešće se primenjuje „swim-up” tehnika ili je dobijeni ejakulat centrifugiran u dvoslojnom gustinskom gradijentu, nakon čega su separirani spermatozoidi, dobrog motiliteta i morfološke građe, ispirani dva puta u medijumu za preparaciju spermatozoida¹⁵⁸.

U fazi fertilizacije svaka oocita se inseminira zavisno od kvaliteta sperme sa 50.000 do 200.000 pokretnih spermatozoida po oocitu. Spermatozoidi i oocite se koinkubiraju 16 do 18 sati u inkubatoru. Oocite se zatim pregledaju u smislu postojanja dva pronukleusa kao dokaz oplodnje i ekstruzije drugog polarnog tela. Svega 60–80% zrelih oocita se oplodi, a približno 6% oocita sadrže tri ili više pronukleusa, što govori u prilog oplodnje sa više spermatozoida. Takve abnormalne embrione treba otkriti i ukloniti u ranom razvoju. U slučaju azospermije ili teškog stepena oligospermije koristi se ICSI metoda (intracitoplasmatic sperm injection) kojom se spermatozoid direktno ubrizgava kroz zonu pelucidu u perivitelinski prostor. Za kulturu embriona koriste se različita hranilišta koja su industrijski proizvedena i standardizovana. Kvalitet embriona uveliko zavisi od specifičnih genetskih i razvojnih programa, i izražava se uglavnom prema dinamici razvoja, morfologiji i stepenu fragmentacije embriona¹⁵⁹.

Embriotransfer je uspešan u bilo kom stadijumu razvoja embriona, počev od pronuklearnog, do stadijuma blastociste, iako se transfer najčešće vrši 72 sata nakon aspiracije oocita, kada je embrion u osmoćelijskom stadijumu. Broj transferiranih embriona zavisi od kvaliteta embriona, godina pacijentkinje i propisa VTO centra. Pri tome morfološka procena kvaliteta embriona je subjektivna, tako da se ponekada prenos i manje kvalitetnih embriona

može završiti trudnoćom. Prenos više od dva embriona povećava stopu multiplih trudnoća za 35%. Višeploidna trudnoća povezana je sa povećanim rizikom spontanog pobačaja, prevremenog porođaja i drugim perinatalnim komplikacijama. Kultivacija embriona do stadijuma blastociste ima za cilj selekciju najkvalitetnijih embriona i redukciju broja transferisanih, te je preporuka nekih centara da se u slučajevima blastociste vrši transfer samo jednog embriona „single embryo transfer”^{160,161}.

Kao lutealna podrška mogu se koristiti progesteron i hCG, pri čemu se progesteronska terapija smatra metodom izbora jer ne povećava rizik za OHSS. Progesteron se može koristiti kao mikronizirani progesteron za vaginalnu primenu ili per os primenu, i u vidu intramuskularne injekcije. Lutealna podrška traje od momenta punkcije folikula do menstruacije ili do 12. nedelje kod pacijentkinja koje su trudne¹⁶².

Prvo merenje beta hCG-a može se obaviti 12 dana od embriotransfera. U slučaju pozitivnih vrednosti radi se kontrolno merenje, gde porast beta hCG-a ukazuje na trudnoću, dok niske vrednosti najčešće govore u prilog takozvane „biohemijske trudnoće”. Ako vrednosti beta hCG-a rastu, potrebno je takvu trudnoću potvrditi klinički tj. transvaginalnim ultrazvučnim nalazom pozitivne srčane akcije embriona u sedmoj nedelji gestacije.

Analizom rezultata postupaka VTO-a nailazimo na kontroverzne podatke koji delom proizilaze iz činjenice da ne postoje jasni kriterijumi šta zapravo čini uspeh VTO postupka. Najvažniji parametri uspeha jesu stopa kliničkih trudnoća i porođaja po aspiraciji, po embriotransferu i po ciklusu stimulacije. Treba imati u vidu da se 20% kliničkih trudnoća nakon VTO završi spontanom pobačajima što dodatno utiče na ishod. Razlozi za uključivanje parova u program VTO su različiti, te i ova činjenica utiče na rezultate VTO-a^{163,164}.

VTO je alternativni tretman infertilnih PCOS pacijentkinja. Dve glavne indikacije za primenu VTO metode kod lečenja infertilnih PCOS pacijentkinja jesu: pacijentkinje sa dugačkim stažom infertiliteta rezistentne na ostale *in vivo* metode lečenja i koegzistencija drugog faktora infertiliteta, naročito tubarnog faktora¹⁰⁴.

Više istraživača je kompariralo uspeh VTO tretmana PCOS pacijentkinja i pacijentkinja sa tubarnim faktorom infertiliteta. Ti izveštaji se odnose na male serije sa siromašnim statističkim značajem. Meta-analiza koju su uradili Heijnen i saradnici 2006. godine, obuhvata devet studija (Dor i saradnici, 1990; Urman i saradnici, 1992; Homburg i saradnici, 1993; Kodama i saradnici, 1995; Hardy i saradnici, 1995; Sengoku i saradnici, 1997; Doldi i saradnici, 1999; Mulders i saradnici, 2003; Urman i saradnici, 2004) sa ukupno 458 PCOS pacijentkinja (793 ciklusa) i 694 kontrolnih ne-PCOS pacijentkinja (1116 ciklusa), pokazuje

da će, uprkos činjenici da je više oocita po ciklusu dobijeno uz nižu stopu fertilizacije, PCOS i ne-PCOS pacijenti postići sličnu stopu trudnoće i živorođene dece po započetom ciklusu¹⁶⁵.

Studija koju su uradili Kodama i saradnici izvestila je o značajno više otkazanih ciklusa u PCOS grupi zbog neposredno teškog OHSS-a (6% u odnosu prema 1%)¹⁶⁶. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno rađenim studijama o incidenci OHSS-a i otkazanih ciklusa kod žena sa PCOS-om (MacDougall i saradnici, 1992; Delvige i saradnici, 1993)^{115,167}.

Koncentracije LH kod bolesnica sa PCOS-om su veće u odnosu na kontrolnu grupu pacijentkinja. Sugerisano je da su povišeni nivoi LH-a kod PCOS pacijentkinja povezani sa povećanom stopom pobačaja¹⁶⁸. Zbog toga je predložena upotreba GnRH agonista koja dovodi do supresije LH i smanjenja ovog rizika¹⁶⁹.

Dor i saradnici objavljuju da ne postoje razlike u stopi ostvarenih trudnoća između PCOS pacijentkinja i normoovulatornih žena sa tubarnim faktorom infertiliteta (30,7:29,7%). Takođe, oni govore o slabom kvalitetu dobijenih oocita, kao i o manjem procentu fertilizacije, ali embriotransfer dva ili tri embriona, daje dobre šanse za implantaciju i trudnoću¹⁷⁰.

VTO je izgleda odgovarajuća opcija lečenja za PCOS pacijente. Mnoga uverenja koja se tiču znatno smanjenih šansi za uspeh i povećane stope komplikacija kod pacijentkinja sa PCOS-om podvrgnutih VTO-u, nije mogla biti potvrđena u meta-analizi Heijnen i saradnika, kao i u mnogobrojnim pojedinačnim studijama. Potreban je veći broj istraživanja i multicentričnih studija da bi se ispitala specifična uloga strategije poput promene stila života, insulinske rezistencije, različitih protokola ovarijalne stimulacije, singl embriotransfera, u definisanju optimalnog VTO lečenja za PCOS pacijente.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je da se proceni uticaj policističnog ovarijalnog sindroma na tok i ishod vantelesnog oplođenja. Saglasno opštem cilju istraživanja, izdvojeni su sledeći konkretni zadaci:

1. Procena ishoda vantelesnog oplođenja tj. utvrđivanje procenta (kliničkih trudnoća i pobačaja) kod žena sa PCOS-om, i žena sa tubarnim uzrokom steriliteta.
2. Utvrđivanje uticaja policističnog ovarijalnog sindroma na tok vantelesnog oplođenja.
3. Ispitati koji protokol ovarijalne stimulacije kod pacijentkinja sa PCOS-om ima najveći uspeh (veći broj zrelih jajnih ćelija, veći broj kliničkih trudnoća), a manji rizik od nastanka ovarijalnog hiperstimulacijskog sindroma.
4. Utvrditi da li postoji razlika u kvalitetu embriona, na osnovu morfologije i dinamike razvoja embriona, na dan embriotransfera između ispitivane i kontrolne grupe, kao i između primenjenih protokola ovarijalne stimulacije.
5. Ispitati kakav uticaj imaju godine života, indeks telesne mase, vrednosti anti-Mullerovog hormona i upotreba metformina na ishod vantelesnog oplođenja kod pacijentkinja sa PCOS-om.

4. ISPITANICE I METODE ISTRAŽIVANJA

Ispitivanje je organizovano po metodu prospektivne komparativne studije. Istraživanje je obavljeno u Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra u Nišu i Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu. Svih 217 učesnica u istraživanju, pre uključivanja u istraživanje, bilo je informisano o ciljevima istraživanja i sve su potpisale informisani pristanak za učešće u istraživanju. Sve pacijentkinje mogle su biti samo jednom uključene u istraživanje. Etički komitet Medicinskog fakulteta u Nišu (rešenje broj 01-9337-19), Etički odbor Kliničkog centra u Nišu (rešenje broj 338/42) i Etički odbor Kliničkog centra Vojvodine (rešenje broj 00-02/904) dali su saglasnost za sprovođenje ovog istraživanja.

4.1. Karakteristike studijske grupe

Studijom je obuhvaćeno 123 pacijentkinja (123 ciklusa) sa policističnim ovarijalnim sindromom uključenih u Nacionalni program vantelesnog oplođenja finansiranog od strane Ministarstva zdravlja Republike Srbije. Sve ispitanice sa PCOS-om kao uzrokom bračne neplodnosti, ostale su rezistentne na prethodne postupke: indukcije ovulacije klomifen citratom samostalno ili u kombinaciji sa metforminom, indukcije ovulacije inhibitorima aromataze, gonadotropinima, laparoskopskim ovarijalnim drilingom i metodama IUI i nisu dovele do zatrudnjavanja. Pacijentkinje su, da bi bile uključene u studiju, morale da ispune kriterijume propisane Rotterdamskim konsenzusom iz 2003. godine, prema kojem se PCOS definiše prisustvom dva od tri navedena parametra: 1. oligo-i/ili anovulacija sa posledičnom oligo/amenorejom; 2. kliničkim i/ili biohemijskim znakovima hiperandrogenizma i/ili hiperandrogenemijom; 3. policističnim izgledom jajnika dokazanim ultrazvukom, a nakon isključenja bolesti koje se slično manifestuju. To su: bolesti štitne žlezde, hiperprolaktinemija, neklasična kongenitalna adrenalna hiperplazija, Cushingov sindrom, virilizujućii tumori, hipotalamičke amenoreje, glukokortikoidna rezistencija, insulinska rezistencija.

4.2. Karakteristike kontrolne grupe

Kontrolnu grupu sačinjavalo je 94 pacijentkinja (94 ciklusa) koje su bile uključene u Nacionalni program vantelesnog oplođenja finansiranog od strane Ministarstva zdravlja Republike Srbije zbog tubarnog uzroka bračnog infertiliteta. Dijagnoza tubarnog uzroka

neplodnosti postavljena je sledećim dijagnostičkim procedurama: histerosalpingografijom (HSG), transvaginalna laparoskopija (TVL), standardnom laparoskopijom.

Tubarni uzrok bračne neplodnosti podrazumeva sledeća stanja: nepostojanje oba jajovoda (odstranjena predhodnim operacijama), nepostojanje jednog jajovoda dok je drugi jajovod neprohodan i postojanje oba jajovoda koja su neprohodna.

4.3. Metode pregleda

Kod svih ispitanica uključenih u istraživanje (studijska i kontrolna grupa) morali su biti rađeni sledeći dijagnostički postupci ispitivanja pre ulaska u program VTO, a po kriterijumima Republičkog fonda za zdravstveno osiguranje i po protokolima Klinika:

- anamnestički podaci oba partnera uzeti od svih ispitanica;
- hormonski profil rađen iz krvi pacijentkinje trećeg dana menstrualnog ciklusa (d 3): FSH, LH, E2, PRL, Pg, AMH,T i hormoni štitne žlezde: TSH, T3,T4;
- skrining grlića: bris po Papanikolau, kolposkopija;
- transvaginalna sonografija ;
- ginekološki pregled sa uzetim brisevima vagine i cerviksa (bakteriološki pregled vaginalnog i cervikalnog brisa, bris na Chlamidiju, Mikoplazmu i Ureaplazmu);
- HbsAg, HCV, HIV, VLDR – serologiju;
- Toxoplasmu gonadii, Rubellu – serologiju;
- ispitivanje stanja kavuma uterusa histeroskopijom;
- ispitivanje prohodnosti jajovoda histerosalpingografijom ili transvaginalnom laparoskopijom;
- dijagnostičko/operativna laparoskopija;
- spermogram i spermokultura, bakteriološki bris, bris na Chlamidiju, Mycoplasmu i Ureoplazmu i serologiju (HbsAg, HCV, HIV, VDRL) muškog partnera.

4.4. Uključujući i isključujući kriterijumi

Kriterijumi za uključivanje u istraživanje bili su istovetni kao kriterijumi za uključivanje u program vantelesnog oplođenja.

Kriterijumi za uključivanje u istraživanje za obe grupe bili su:

1. PCOS ili tubarni uzrok steriliteta;
2. Bazalne vrednosti FSH (d3) ≤ 15 iJ/ml (elisa);
3. Bazalne vrednosti AMH veće od 0,5;
4. BMI <30 kg/m²;
5. Godine života žene ≤ 40 ;
6. Spermogram partnera u granicama normospermije ili oligoasthenoteratospermije gr I/II;
7. Lečena hiperplarolaktinemija i hipotireoza ili hipertireoza kao udružene bolesti sa PCOS, sa urednim vrednostima hormona;
8. Nepostojanje genitalne infekcije;

Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja bili su:

1. Drugi uzroci steriliteta (endometriozna, nerešena patologija kavuma uterusa, imunološki uzroci, idiopatski);
2. BMI >30 kg/m²;
3. Godine života žene >40 ;
4. Teži poremećaji spermatogeneze partnera koji zahtevaju ICSI metodu (oligoasthenoteratospermia gr III/IV);
5. Postojanje hronične sistemske bolesti;
6. Postojanje hepatitisa C ili HIV infekcije;
7. Nelečena hipo ili hipertireoza ili hiperprolaktinemija.

4.5. Parametri koji su praćeni tokom istraživanja

U toku programa VTO pratili smo sledeće parametre kod obe grupe pacijentkinja:

- Godine starosti pacijentkinje;
- BMI - indeks telesne mase u kg/m²;
- Bazalne vrednosti hormona: FSH, LH, PRL, E2, AMH;
- Ukupna doza u IU utrošenih za ovarijalnu stimulaciju;
- Protokol stimulacije (duga i kratka šema agonistima GnRH i kratka šema GnRH antagonistima);
- Dužina stimulacije u danima;
- Broj folikula ≥ 16 mm viđenih UZ pregledom;
- Vrednost E2 merena 6. dana stimulacije;

- Debljina endometrijuma;
- Broj dobijenih jajnih ćelija aspiracijom folikularne tečnosti;
- Stopa fertilizacije;
- Broj dobijenih embriona;
- Broj transferiranih embriona;
- Kvalitet transferiranih embriona;
- Ukupna stopa trudnoće po embriotransferu;
- Stopa biohemijskih trudnoća po embriotransferu;
- Stopa kliničkih trudnoća po embriotransferu;
- Stopa pobačaja po nastalim kliničkim trudnoćama;
- Stopa multifetalnih trudnoća po embriotransferu;
- Ukupna stopa prekinutih ciklusa VTO (zbog nedobijenih jajnih ćelija, nedobijenih embriona, neadekvatnog odgovora jajnika);
- Incidenca OHSS.

4.6. Dobijanje i priprema jajne ćelije

Sve pacijentkinje su u ciklusu pre početka stimulacije ovulacije, od drugog dana spontanog menstrualnog krvarenja ili krvarenja izazvanog gestagenima, koristile oralne kontraceptive. Deo pacijentkinja je tretiran standardnim dugim protokolom: davanjem GnRH agonista triptorelin (Diphereline 0,1 mg, Ipsen Pharma Biotech, France) subkutano, svakodnevno počev od 21. dana prethodnog ciklusa. Nakon postignute prolazne hipofizne supresije ($E2 < 20$ pg/ml i $LH < 2,0$ mIU/ml u serumu) započinjana je stimulacija ovarijuma rFSH (folitropin alfa – Gonal F, Serono Pharma, Švajcarska ili folitropin beta – Puregon, Organon, Holandija) i/ili hMG (Menopur, Ferring, Nemačka) u dozama koje su individualno određivane za svaku pacijentkinju, a zavisno od njenih godina života, broja antralnih folikula viđenih ultrazvukom i bazalnih vrednosti hormona (FSH, LH i AMH). Ovarijalni odgovor na gonadotropine praćen je transvaginalnom sonografijom i merenjem serumskih vrednosti E2 počev od 6. dana stimulacije.

Kratki protokol agonistima zbog svog „flere up” efekta primenjivan je samo kod pacijentkinja u kontrolnoj grupi. Sa GnRH agonistom triptorelinom (Diphereline 0,1 mg) kretalo se drugi ili treći dan menstrualnog krvarenja, a sa primenom gonadotropina (Gonal F, Puregon, Menopur) dan iza toga.

Kod pacijentkinja kod kojih je primenjivan fleksibilni protokol antagonistima GnRH, kretalo se drugog dana menstrualnog krvarenja sa ovarijalnom stimulacijom gonadotropinima svakodnevno, dok jedan od folikula ne dostigne veličinu od 13 mm i vrednosti $E_2 > 300$ pg/ml. Nakon toga, svakodnevno je primenjivan cetorelix acetata 0,25 mg (Cetrotide, Merc Serono, Švajcarska) uz svakodnevnu primenu gonadotropina. Ovarijalni odgovor kod kratkih protokola agonistima i antagonistima praćen je na identičan način kao i kod dugog protokola agonistima.

Nakon ultrazvučne verifikacije dominantnog folikula, dijametra ≥ 18 mm, uz prateća dva folikula ≥ 16 mm, ili tri folikula dijametra ≥ 17 mm, uz odgovarajući porast serumskog estradiola, u cilju dovršavanja mejotičke deobe oocita, jednokratno je intramuskularno aplikovano 10.000 IU humanog horionskog gonadotropina – hCG (Pregnyl, Organon, Holandija). Transvaginalna aspiracija folikula rađena je pod kontrolom ultrazvuka, u kratkotrajnoj intravenskoj anesteziji, 34–36 sati nakon indukcije ovulacije, aspiracionom pumpom sa pod pritiskom od 140–150 mmHg. Lutealna suplementacija je kretala od dana aspiracije folikula, vaginalnom aplikacijom kapsula mikroniziranog progesterona (Utrogestan, Laboratories Besins-International S.A., Francuska), tri puta dnevno po 200 mg, sve do pojave menstrualnog krvarenja u slučaju izostanka nidacije ili do 12. nedelje trudnoće.

Pregled dobijenog folikularnog sadržaja, identifikacija i kolekcija oocita su vršeni na stereozoom mikroskopu. Istovremeno je procenjivana zrelost dobijenih oocit-corona-kumulus kompleksa. Zrele ili preovulatorne jajne ćelije, zaustavljene u metafazi II mejotičke deobe, su bile ćelije sa zrakasto postavljenim ćelijama corone radiate i kumulusom ooforusom veličine 0,5–0,8 cm. Otprilike 95% zrelih jajnih ćelija ima izbačeno prvo polarno telo pa su i fiziološki zrele za oplodnju.

4.7. Dobijanje i priprema semena

Spermatozoidi su dobijani iz ejakulata masturbacijom nakon 3–4 dana apstinencije, u sterilnoj posudi, pre aspiracije jajne ćelije. Nakon likvefikacije na sobnoj temperaturi urađena je inicijalna analiza semena, uljučujući sledeće parametre: volumen ejakulata, koncentracija i ukupan broj spermatozoida u ejakulatu, motilitet, kao i morfologija spermatozoida. Koncentracija i pokretljivost evaluirani su u Maklerovoj komori, a gradacija pokretljivosti izvršena je prema preporuci Svetske zdravstvene organizacije (WHO). Morfologija spermatozoida određivana je kriterijumima po Krugeru.

Dobijeni ejakulat je centrifugiran u dvoslojnom gustinskom gradijentu, nakon čega su separirani spermatozoidi, dobrog motiliteta i morfološke građe, ispirani dva puta u medijumu za preparaciju spermatozoida.

4.8. IVF procedura, evaluacija fertilizacije i razvoja embriona

Dobijene jajne ćelije su kolektirane u petri šolje sa medijumom za ispiranje, ispirane od folikularne tečnosti i nakon toga stavljane u kultivacioni medijum u inkubator najmanje jedan sat pre primene metode oplodnje. Vreme inseminacije dobijenih ćelija je određivano na osnovu stepena njihove zrelosti. Preovulatorne jajne ćelije su inseminirane 3–4 sata nakon kolekcije, dok su nezrele oocite inseminirane kasnije. Spermatozoidi su dodavani u koncentraciji od 50.000 do 200.000 progresivno pokretnih spermatozoida po jajnoj ćeliji, zavisno od kvaliteta spermatozoida (pokretljivosti i građe).

Provera fertilizacije je vršena 16 do 18 sati nakon inseminacije. Oplodene jajne ćelije sa dva pronukleusa su prebacivane u sveži kultivacioni medijum i kultivisane sve do dana embriotransfera, uz svakodnevno praćenje dinamike razvoja i kvaliteta embriona. Dinamika razvoja embriona podrazumevala je da broj blastomera u trenutku provere odgovara očekivanom broju, dok su se morfološke karakteristike embriona odnosile na jednakost blastomera i prisustvo citoplazmatskih fragmenata.

Stopa fertilizacije (FR) predstavlja broj oplodjenih oocita/broj inseminiranih oocita.

Procena kvaliteta embrina vršena je na osnovu morfologije i dinamike razvoja embriona. Morfološke karakteristike su jednakost ili nejednakost blastomera, i prisustvo ili odsustvo citoplazmatskih fragmenata. Dinamika razvoja embriona podrazumevala je da broj blastomera u trenutku provere odgovara očekivanom broju, a pratila se na svaka 24 sata sve do dana embriotransfera. Na osnovu toga je formiran sistem ocene kvaliteta embriona pri čemu su embrioni svrstani u četiri klase. Embrioni klase I trećeg dana ispunjavali su sva tri kriterijuma: 1. imali su 6 do 8 blastomera; 2. sve blastomere su bile jednake; 3. bez fragmentacije. Embrioni klase II nisu zadovoljavali jedan od zadatih kriterijuma. Imali su manje od 6 blastomera ili su imali 6 do 8 nejednakih blastomera, ili je bila prisutna fragmentacija. Embrioni klase III nisu zadovoljavali dva od tri navedena kriterijuma i embrioni klase IV nisu zadovoljavali sva tri gore navedena kriterijuma.

4.9. Embriotransfer

Transfer embriona je rađen trećeg dana pod kontrolom ultrazvuka. Za embriotransfer korišćen je Cook-ov ili Labotec-ov kateter. Broj transferiranih embriona je zavisio od kvaliteta embriona, starosti pacijentkinje, kao i broja prethodnih neuspelih pokušaja vantelesnog oplodjenja, a maksimalan broj za transfer je bio tri embriona.

Prvo merenje beta HCG-a iz krvi rađeno je 12-og dana od embriotransfera. U slučaju pozitivnih vrednosti radilo se kontrolno merenje, gde je porast beta HCG-a ukazivao na trudnoću, dok su niske vrednosti najčešće govorele u prilog takozvane „biohemijske trudnoće”. Kliničkom trudnoćom su proglašavane samo one trudnoće kod kojih je u sedmoj gestacijskoj nedelji ultrazvučno verifikovan eho ploda sa pozitivnom srčanom akcijom.

Stopa implantacije predstavlja broj gestacijskih meškova/broj transferiranih embriona.

4.10. Gradacija OHSS-a

Pacijentkinje koje su razvijale simptome i kliničku sliku OHSS-a, gradirali smo na sledeći način: koristili smo modifikovan Golanov sistem klasifikacije koji se zasnivao na kombinovanju nekoliko kriterijuma, kako bi objasnili težinu OHSS-a. Gradus I je uključivao pacijente sa abdominalnom distenzijom i nelagodnošću, što je prepoznato kao simptom blagog OHSS-a. Takođe, mučnina, povraćanje, dijareja i ultrazvučni nalaz jajnika od 5–12 cm su spadali u blagi OHSS. Gradus II ili umereni OHSS uključivao je nalaz blagog OHSS-a sa pridodatim nalazom slobodne ascitne tečnosti verifikovane ultrazvukom. Gradus III ili teški OHSS uključivao bi pacijente čije je medicinsko stanje zahtevalo hospitalizaciju ili pacijente koji su ispunjavali jedan ili više kriterijuma za hospitalizaciju. Kriterijumi za hospitalizaciju su: ascit, hidrotoraks, hematokrit $\geq 45\%$, oligurija, povišeni enzimi jetre, otežano disanje, anasarka ili akutna bubrežna insuficijencija.

4.11. Statistička obrada i prezentacija podataka

Podaci dobijeni istraživanjem statistički su obrađeni programom SPSS v. 15.0. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Kontinualne varijable predstavljene su aritmetičkom sredinom (\bar{X}), standardnom devijacijom (SD) i merom centralne tendencije – medijanom (Me). Kvalitativna obeležja promenljivih predstavljena su učestalostima (n) i procentualnom zastupljenošću (%).

U zavisnosti od veličine uzoraka, normalnost distribucije kontinualnih varijabli, utvrđivana je Kolmogorov-Smirnov ili Shapiro-Wilk-ovim testom.

Značajnosti razlike (p) kontinualnih varijabli dve nezavisne grupe ispitivana je Studentovim t-testom nezavisnih uzoraka za normalne distribucije podataka, odnosno Mann-Whitnijev U test, za distribucije podataka koje odstupaju od normalne.

Statistička značajnosti razlika apsolutnih frekvencija između uzoraka utvrđivana je χ^2 testom, odnosno Fisher-ovim testom egzaktne verovatnoće, kada je apsolutna frekvencija obeležja manja od 5.

Povezanost kontinualnih promenljivih određivana je Pearsonovim koeficijentom linearne korelacije za normalnu distribuciju varijabli, a ukoliko distribucije nisu normalne korišćen je Spearmanov koeficijent korelacije rangova.

Kao prag statističke značajnosti definisana je standardna vrednost – $p < 0,05$.

Značajnost uticaja prediktorskih varijabli na zavisnu dihotomnu varijablu utvrđivana je univarijantnom i multivarijantnom logističkom regresionom analizom.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je obavljeno u Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra u Nišu i Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu. Istraživanjem je bilo obuhvaćeno 217 pacijentkinja koje su bile u Nacionalnom programu vantelesnog oplođenja finansiranog od strane Ministarstva zdravlja Republike Srbije.

5.1. Uticaja PCOS-a na tok i ishod VTO-a

Prikazani su rezultati toka i ishoda postupka vantelesnog oplođenja kod 123 (56,68%) pacijentkinje, studijske grupe, koje su u program bile uključene zbog policističnog ovarijalnog sindroma kao uzroka infertiliteta. Takođe, prikazani su rezultati toka i ishoda postupka vantelesnog oplođenja kod 94 (43,32%) pacijentkinje sa tubarnim uzrokom bračne neplodnosti koje su činile kontrolnu grupu.

5.1.1. Distribucija ispitanica po godinama starosti, BMI-u i hormonskom statusu

Ispitane pacijentkinje su bile u starosnoj dobi od 23–40 godina. U studijskoj grupi prosečna starost pacijentkinja bila je 31,63 (SD±4,05) a u kontrolnoj 34,35 (SD±3,85). Ispitanice kontrolne grupe statistički su značajno starije u odnosu na ispitanice studijske grupe $p < 0,001$. Godine starosti ispitanica studijske i kontrolne grupe prikazane su u tabeli 4.

Tabela 4. Godine starosti ispitanica studijske i kontrolne grupe

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me))

	Studijska grupa n=123	Kontrolna grupa n=94
Godine starosti	31,63 ± 4,05 (32,00)	34,35 ± 3,85 ^{***} (36,00)

^{***} – $p < 0,001$ (Mann-Whitney test)

Prosečan BMI kod ispitanica studijske grupe iznosio je 23,30 (SD±2,94) a kod pacijentkinja kontrolne grupe 23,24 (SD±3,24). Nađena razlika u BMI između studijske i kontrolne grupe nije statistički značajna i prikazana je u tabeli 5.

Tabela 5. BMI ispitanica studijske i kontrolne grupe(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me))

	Studijska grupa	n=123	Kontrolna grupa	n=94
BMI (kg/m ²)	23,30 ± 2,94	(23,00)	23,24 ± 3,24	(23,00)

n.s. (Mann-Whitney test)

Bazalne vrednosti hormona ispitanica studijske i kontrolne grupe date su u tabeli 6.

Tabela 6. Bazalne vrednosti hormona 3.dana MC ispitanica studijske i kontrolne grupe(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me))

	Studijska grupa	n=123	Kontrolna grupa	n=94
FSH (mIU/ml)	5,43 ± 1,73	(5,10)	7,57 ± 2,93 ^{***}	(7,10)
LH (mIU/ml)	7,09 ± 2,86 ^{***}	(6,80)	4,86 ± 2,00	(4,60)
AMH (ng/ml)	6,87 ± 3,32 ^{***}	(6,30)	1,76 ± 1,19	(1,40)
LH/FSH	1,44 ± 0,79 ^{***}	(1,27)	0,70 ± 0,32	(0,67)

^{***} – $p < 0,001$ (Student t-test nezavisnih uzoraka i Mann-Whitney test)

Bazalne vrednosti FSH statistički su bile više u kontrolnoj grupi, dok su bazalne vrednosti LH i AMH, kao i odnos LH/FSH bile više u studijskoj grupi. Sve statistički značajne razlike su na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$.

Zastupljenost primenjenih protokola stimulacije ovulacije prikazani su u tabeli 7. U studijskoj grupi, od 123 pacijentkinje sa PCOS-om, kod 78 (63,41%) pacijentkinja bio je primenjen dugi protokol sa GnRH agonistima, a kod 45(36,59%) pacijentkinja stimulacija je izvršena protokolom sa GnRH antagonistima. Od 94 pacijentkinja kontrolne grupe, sa tubarnim uzrokom infertiliteta, kontrolisana ovarijalna stimulacija dugim protokolom GnRH agonistima izvršena je kod 34 pacijentkinje (36,17%), kod 37 pacijentkinja (39,36%) kratkim protokolom GnRH agonistima, a kod 23 (24,47%) pacijentkinje stimulacija je izvršena protokolom sa GnRH antagonistima.

Tabela 7. Primenjeni protokoli stimulacije kod ispitanica studijske i kontrolne grupe

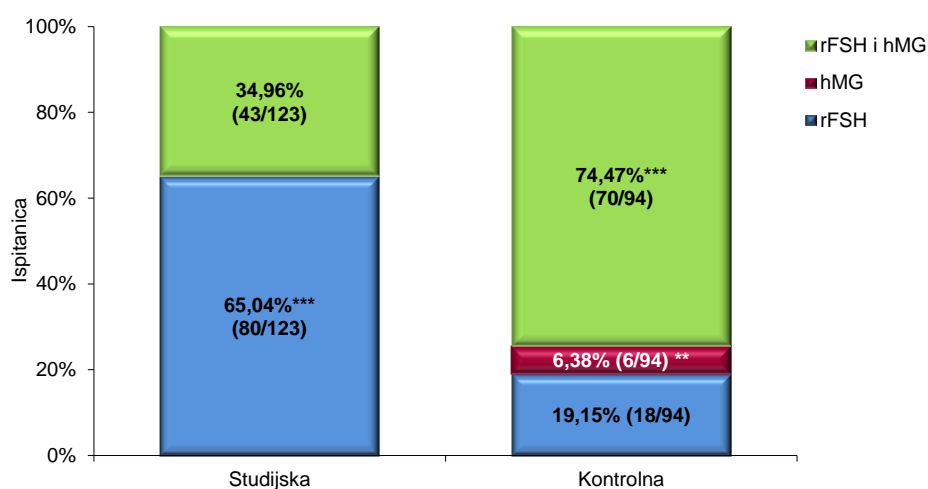
Protokol stimulacije	Studijska grupa (n=123)		Kontrolna grupa (n=94)		Ukupno	
Agonisti GnRH-duga šema	78	^{a**b*} 63,41%	34	36,17%	112	51,61%
Agonisti GnRH-kratka šema	0	0,00%	37	39,36%	37	17,05%
Antagonisti GnRH	45	36,59%	23	24,47%	68	31,34%

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ (χ^2 test)

^a – vs kratka šema antagonistima, ^b – vs kontrolna grupa

U studijskoj grupi, kod pacijentkinja sa PCOS-om, dugi protocol sa GnRH agonistima je statistički češće korišćen u stimulaciji ovulacije od protokola sa GnRH antagonistima ($p < 0,01$). U poređenju sa kontrolnom grupom, dugi protocol sa GnRH agonistima se, takođe, statistički češće koristi u studijskoj grupi sa statističkom značajnošću od ($p < 0,05$).

U pogledu primene gonadotropina, kod 80 (65,04%) pacijentkinja studijske grupe, stimulacija ovulacije je izvršena isključivo upotrebom rekombinovanog FSH-a, a kod 43 (34,96%) pacijentkinje, za stimulaciju ovulacije korišćena je kombinovana primena rekombinovanog FSH-a i humanih menopausalnih gonadotropina. U kontrolnoj grupi kod 18 (19,15%) pacijentkinja za stimulaciju ovulacije korišćen je isključivo rekombinovani FSH, kod 6 (6,38%) pacijentkinja samo humani menopausalni gonadotropini, a kod 70 (74,47%) pacijentkinja stimulacija ovulacije izvršena je kombinovanom primenom rekombinovanog FSH-a i humanih menopausalnih gonadotropina. Vrsta gonadotropina koji su korišćeni u ovarijalnoj stimulaciji, prema grupama pacijentkinja prikazana je u grafikonu 1.

**Grafikon 1.** Vrsta gonadotropina primenjenih za stimulaciju ovulacije

** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (χ^2 test)

Na osnovu tabele kontigencije 3×2 postoji statistički značajna razlika u korišćenju rFSH-a i hMG-a, i njihove kombinacije u korišćenju gonadotropina između studijske i kontrolne grupe ($p < 0,001$). Samo rFSH se statistički značajno češće koristi kod pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na kontrolnu grupu, a kombinacija rFSH-a i hMG-a statistički ređe ($p < 0,001$). Primena samo hMG gonadotropina za stimulaciju ovulacije, korišćena je isključivo kod pacijentkinja kontrolne grupe, i to kod njih 6 (6,38%), sa statističkom značajnošću ($p < 0,01$), u odnosu na studijsku grupu. Ovi rezultati prikazani su u tabeli 8.

Tabela 8. Vrsta gonadotropina primenjenih za stimulaciju ovulacije

Gonadotropini	Studijska grupa (n=123)	Kontrolna grupa (n=94)
rFSH	80 *** 65,04%	18 19,15%
hMG	0 0,00%	6 ** 6,38%
rFSH i hMG	43 34,96%	70 *** 74,47%

** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (χ^2 test)

5.1.2. Karakteristike ovarijalnog odgovora

Karakteristike ovarijalnog odgovora na stimulaciju ispitanica sa policističnim ovarijalnim sindromom i kontrolne grupe prikazane su u tabeli 9.

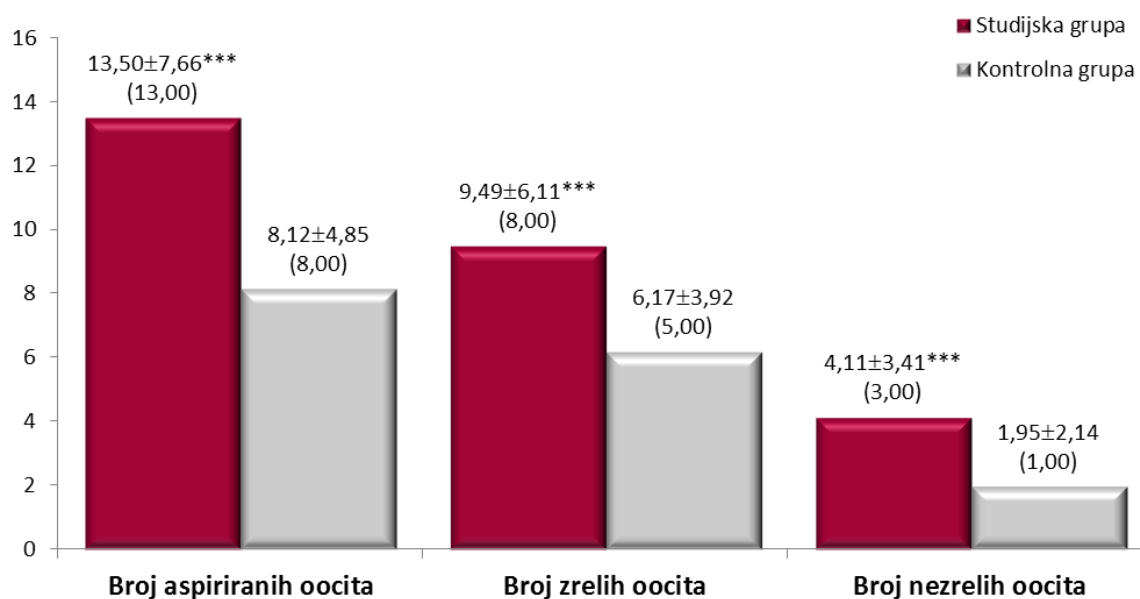
Tabela 9. Karakteristike ovarijalnog odgovora

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me))

	Studijska grupa (n=123)	Kontrolna grupa (n=94)
Dužina stimulacije (br. dana)	10,37 ± 2,23 (10,00)	10,11 ± 1,83 (10,00)
Količina gonadotropina (IU)	1634,35 ± 528,88 (1575,00)	2408,24 ± 910,48 *** (2250,00)
Broj folikula ≥16 mm	12,71 ± 6,56 *** (12,00)	6,53 ± 4,11 (6,00)
Broj aspiriranih oocita	13,50 ± 7,66 *** (13,00)	8,12 ± 4,85 (8,00)
Broj zrelih oocita	9,49 ± 6,11 *** (8,00)	6,17 ± 3,92 (5,00)
Broj nezrelih oocita	4,11 ± 3,41 *** (3,00)	1,95 ± 2,14 (1,00)
Estradiol 6. dana (pg/ml)	841,75 ± 612,46 (708,00)	790,55 ± 642,21 (540,00)
Debljina endometrijuma (mm)	10,28 ± 1,49 *** (10,00)	9,37 ± 1,76 (9,00)

*** – $p < 0,001$ (Student t-test nezavisnih uzoraka i Mann-Whitney test)

Prosečno vreme trajanja stimulacije izraženo u danima u studijskoj grupi ($10,37 \pm 2,23$), bilo je duže, ali ne i statistički značajno u odnosu na vreme trajanja stimulacije kod ispitanica kontrolne grupe, gde je iznosilo ($10,11 \pm 1,83$). Srednja vrednost utrošene ukupne količine gonadotropina za postizanje ovarijalne stimulacije kod pacijentkinja sa PCOS-om iznosila je ($1634,35 \pm 528,88$) IU, dok je statistički značajno više gonadotropina moralo biti upotrebljeno u kontrolnoj grupi ($2408,24 \pm 910,48$), u odnosu na studijsku grupu ($p < 0,001$). Vrednosti broja folikula ≥ 16 mm viđenih ultrazvukom, bile su statistički značajno veće u grupi pacijentkinja sa PCOS-om ($12,71 \pm 6,56$) nego u kontrolnoj grupi ($6,53 \pm 4,11$). Takođe, srednja vrednost dobijenih oocita aspiracijom folikula, srednja vrednost broja zrelih i broja nezrelih oocita statistički je značajno veća kod pacijentkinja sa PCOS-om ($p < 0,001$), i one su prikazane u grafikonu 2. U studijskoj grupi postoji jedna pacijentkinja kod koje aspiracijom folikula nije dobijena niti jedna jajna ćelija, pa je broj ispitanica studijske grupe $n=122$. Debljina endometrijuma merena na dan davanja hCG-a u mm statistički je bila značajno veća kod ispitanica studijske grupe, u odnosu na kontrolnu ($p < 0,001$).



Grafikon 2. Karakteristike jajnih ćelija dobijenih aspiracijom folikula pacijentkinja studijske i kontrolne grupe

*** – $p < 0,001$ (χ^2 test)

5.1.3. Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije

Ukupan broj dobijenih oocita kod pacijentkinja sa PCOS-om bio je 1660, a u kontrolnoj grupi 763. Učešće zrelih oocita u ukupnom broju aspiriranih oocita statistički je izraženije u kontrolnoj grupi (76,02%) nego u PCOS grupi (69,76%) ispitanica ($p < 0,01$). Učešće zrelih oocita u ukupnom broju aspiriranih oocita u obe grupe ponaosob, statistički je češće od nezrelih ($p < 0,001$, χ^2 test). Mann-Whitney testom je utvrđeno da je srednji broj oplođenih jajnih ćelija statistički značajno veći u studijskoj grupi ($p < 0,001$). Primećena je statistički veća stopa fertilizacije IVF metodom u kontrolnoj grupi (73,26%) nego u grupi pacijentkinja sa PCOS-om (66,14%) sa nivoom statističke značajnosti od ($p < 0,001$). Kod tri ispitanice studijske grupe, aspiracijom folikula nisu dobijene zrele jajne ćelije, pa je broj ispitanica studijske grupe $n=119$. Zrelost jajnih ćelija i uspešnost fertilizacije prikazani su u tabeli 10.

Tabela 10. Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategoriske varijable apsolutnim brojevima)

	Studijska grupa (n=123)	Kontrolna grupa (n=94)
Ukupan br. aspiriranih oocita	1660	763
Ukupan br. zrelih oocita	1158 69,76%	580 **76,02%
Ukupan br. nezrelih oocita	502 30,24%	183 23,98%
Ukupan br. oplođenih oocita	1098	559
Srednji br. oplođenih oocita	$9,23 \pm 6,11^{***}$ (8,00)	$5,95 \pm 3,76$ (5,00)
Stopa fertilizacije	66,14%	73,26% ***

** – $p < 0,01$ *** – $p < 0,001$ (χ^2 test i Mann-Whitney test)

5.1.4. Kvalitet embriona

U studijskoj grupi dobijeno je ukupno 935 embriona dok je ukupan broj embriona u kontrolnoj grupi 496. Srednji broj dobijenih embriona kod ispitanica statistički je značajno veći u studijskoj grupi ($7,99 \pm 4,77$) u odnosu na kontrolnu grupu ($5,33 \pm 3,21$) pacijentkinja ($p < 0,001$, Mann-Whitney test). U obe ispitivane grupe najviše je embriona kvaliteta I klase, a zapaža se tendencija manjeg broja embriona nižih klasa kvaliteta, te je najmanji procenat svih dobijenih embriona sa klasom IV. Poređenjem studijske i kontrolne grupe Pearsonovim χ^2 testom nije ustanovljena statistički značajna razlika u kvalitetu embriona 3. dana. Rezultati prikazani u tabeli 11.

Tabela 11. Embriološke karakteristike dobijenih embriona 3. dana u studijskoj i kontrolnoj grupi

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima)

	Studijska grupa n=117	Kontrolna grupa n=93
Srednji broj dobijenih embriona	$7,99 \pm 4,77^{***}$ (7,00)	$5,33 \pm 3,21$ (5,00)
Kvalitet dobijenih embriona		
Klasa I	311 33,26%	150 30,24%
Klasa II	234 25,03%	141 28,43%
Klasa III	210 22,46%	120 24,19%
Klasa IV	180 19,25%	85 17,14%
Ukupan broj embriona	935	496

*** – $p < 0,001$ (Mann-Whitney test)

Ukupan broj transferisanih embriona u PCOS ispitanica iznosio je 318, a u kontrolnoj grupi 240, i prikazan je u tabeli 12. U obe grupe najviše transferisanih embriona je bilo embriona klase I, (58,49%) u studijskoj i (50,83%) u kontrolnoj grupi pacijentkinja. I ovde se zapaža tendencija manjeg broja embriona nižih klasa kvaliteta. Poređenjem studijske i kontrolne grupe Pearsonovim χ^2 testom, nije ustanovljena statistički značajna razlika između kvaliteta transferisanih embriona. Srednji broj transferisanih embriona u grupi sa PCOS-om ($2,72 \pm 0,58$) i kontrolnoj grupi ($2,58 \pm 0,70$) žena, nije se značajno razlikovao.

Tabela 12. Embriološke karakteristike transferiranih embriona u studijskoj i kontrolnoj grupi

	Studijska grupa	Kontrolna grupa
Srednji broj transferiranih embriona	$2,72 \pm 0,58$ (3,00)	$2,58 \pm 0,70$ (3,00)
Kvalitet transferiranih embriona		
Klasa I	186 58,49%	122 50,83%
Klasa II	83 26,10%	61 25,42%
Klasa III	37 11,64%	39 16,25%
Klasa IV	12 3,77%	18 7,50%
Ukupan broj transferiranih embriona	318	240

5.1.5. Uspeh VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS–om

Rezultati ishoda vantelesnog oplođenja sa prisutnim komplikacijama samog postupka i komplikacijama ostvarenih trudnoća kod pacijentkinja sa policističnim ovarijalnim sindromom i kontrolne grupe, prikazani su u tabeli 13.

Tabela 13. Poređenje kliničke efikasnosti u studijskoj i kontrolnoj grupi

Broj	Studijska grupa n=123 (sa ET n=117)	Kontrolna grupa n=94 (sa ET n=93)
Stopa implantacije	22,64% (72 vs 318)	17,92% (43 vs 240)
Ukupno trudnoća po ET (%)	60 51,28% (vs 117)	36 38,71% (vs 93)
Kliničkih trudnoća po ET (%)	57 48,72% (vs 117)	33 35,48% (vs 93)
Biohemijskih trudnoća po ET (%)	3 2,56% (vs 117)	3 3,23% (vs 93)
Stopa multifetalnih trudnoća	21,67%	22,22%
Broj multifetalnih trudnoća po ET	13 11,11% (vs 117)	8 8,60% (vs 93)
Dvojke	11 9,40% (vs 117)	7 7,53% (vs 93)
Trojke	2 1,71% (vs 117)	1 1,08% (vs 93)
Pobačaji po ET	8 6,84% (vs 117)	5 5,38% (vs 93)
Stopa pobačaja po klinič. trudnoć.	14,04%	15,15%
Otkazani ciklusi	6 4,88% (vs 123)	1 1,06% (vs 94)
Bez dobijenih oocita	1 0,81%	
Bez oplođenih oocita	3 2,44%	
Bez embriotransfera	2 1,63%	1 1,06%
OHSS	17 13,82% ***	0 0,00%
OHSS gradus I	15 12,20% ***	0 0,00%
OHSS gradus II	2 1,63%	0 0,00%

*** – $p < 0,001$ (χ^2 test)

Broj ispitanica studijske grupe kod kojih je ostvarena klinička trudnoća je 57 (48,72%) i on je gotovo statistički značajno veći u odnosu na njihov broj u kontrolnoj grupi 33 (35,48%) po embriotransferu ($p=0,0548$). Bez statistički značajnih razlika, u studijskoj grupi je veća i stopa implantacije (22,64% vs 17,92%).

U studijskoj grupi je veća zastupljenost multifetalnih trudnoća (11,11% vs 8,60%), dok je njihova stopa (njihov broj u odnosu na ukupan broj trudnoća) minimalno niža (21,67% vs 22,22%). Takođe je u studijskoj grupi veća zastupljenost ispitanica sa pobačajem (8, tj. 6,84% vs 5, tj. 5,38%), dok je stopa pobačaja (broj pobačaja u odnosu na broj kliničkih trudnoća), nešto niža (14,04% vs 15,15%).

Broj otkazanih ciklusa u odnosu na ukupan broj ispitanica, veći je u studijskoj grupi (6, tj. 4,88%) no u kontrolnoj (1, tj. 1,06%) grupi, kao i svi uzroci koji su doveli do otkazivanja, ali bez statistički značajne razlike.

OHSS bio je prisutan samo kod pacijentkinja sa PCOS-om, i to kod njih 17 (13,82%), što je statistički značajno više u odnosu na kontrolnu grupu gde nije bilo ispitanica sa simptomima OHSS ($p < 0,001$). OHSS gradusa I prisutan je kod 15 (12,20%) ispitanica, a gradus II kod 2 (1,63%) pacijentkinje studijske grupe, pa je i zastupljenost OHSS gradusa I statistički značajno veća u studijskoj u odnosu u kontrolnu grupu ($p < 0,01$).

5.2. Uticaja protokola stimulacije na tok i ishod VTO-a

Stimulacija ovulacije kod pacijentkinja sa PCOS-om izvršena je kod njih 78 (63,41%) dugim protokolom agonistima GnRH, što je statistički značajno više od broja onih kod kojih je stimulacija ovulacije izvršena protokolom sa antagonistima GnRH 45 (36,59%) ($p < 0,01$, χ^2 test).

5.2.1. Distribucija ispitanica po godinama starosti, BMI-u i hormonskom statusu

Tabela 14. Antropološki parametri ispitanica studijske grupe u odnosu na primenjeni protokol stimulacije (vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me))

Parametar	Studijska grupa			
	Agonisti GnRH-duga n=78		Antagonisti GnRH n=45	
Godine starosti	$31,79 \pm 4,08$	(31,50)	$31,36 \pm 4,02$	(32,00)
BMI (kg/m^2)	$23,35 \pm 2,82$	(23,00)	$23,22 \pm 3,16$	(23,00)

(Studentov t-test, Mann-Whitney test)

Nema statistički značajne razlike u godinama starosti i BMI između ispitanica studijske grupe kod kojih je za stimulaciju ovulacije bio korišćen protokol sa agonistima GnRH – duga šema, i protokol sa antagonistima GnRH.

Tabela 15. Bazalne vrednosti hormona ispitanica studijske grupe u odnosu na primenjeni protokol stimulacije (vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me))

Parametar	Studijska grupa			
	Agonisti GnRH – duga		Antagonisti GnRH	
	n=78		n=45	
FSH (mIU/ml)	5,35 ± 1,68	(4,90)	5,56 ± 1,82	(5,30)
LH (mIU/ml)	7,20 ± 3,26	(6,75)	6,88 ± 2,01	(7,10)
AMH (ng/ml)	6,94 ± 3,56	(6,25)	6,75 ± 2,89	(6,40)
LH/FSH	1,44 ± 0,70	(1,27)	1,44 ± 0,93	(1,17)

(Mann-Whitney test)

Nije bilo značajnih razlika ni u bazalnim vrednostima hormona između ispitanica studijske grupe kod kojih su korišćeni različiti protokoli stimulacije, tabela 15.

5.2.2. Karakteristike ovarijalnog odgovora

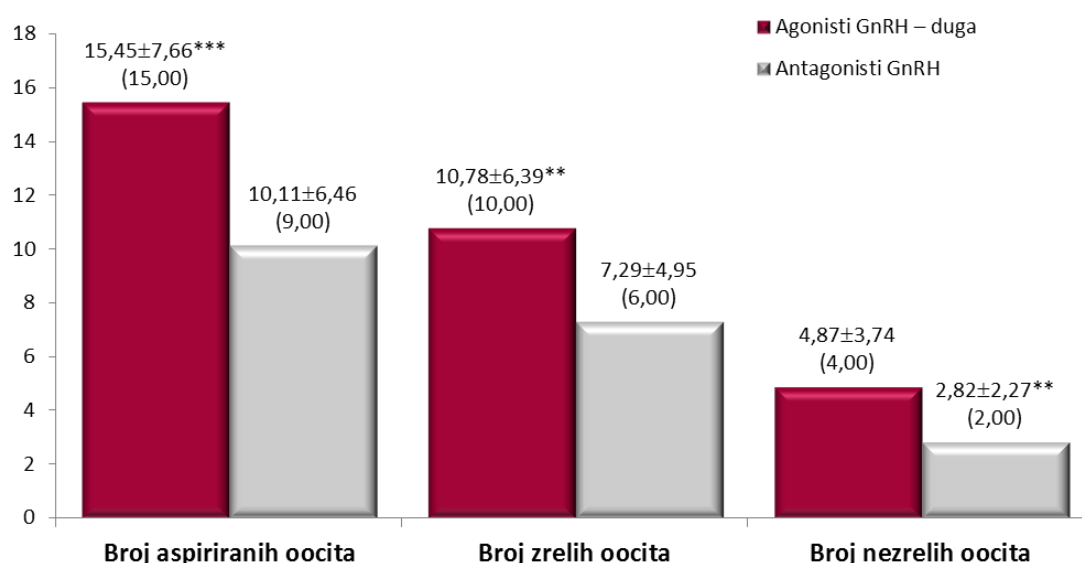
Tabela 16. Karakteristike ovarijalnog odgovora kod pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na primenjeni protokol stimulacije (vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me))

Parametar	Studijska grupa			
	Agonisti GnRH – duga		Antagonisti GnRH	
	n=78		n=45	
Dužina stimulacije (br. dana)	10,90 ± 1,94	*** (11,00)	9,44 ± 2,40	(9,00)
Količina gonadotropina (IU)	1620,03 ± 482,28	(1562,50)	1659,17 ± 606,24	(1575,00)
Broj folikula ≥ 16 mm	14,71 ± 6,61	*** (14,00)	9,24 ± 4,83	(9,00)
Broj aspiriranih oocita	15,45 ± 7,66	*** (15,00)	10,11 ± 6,46	(9,00)
Broj zrelih oocita	10,78 ± 6,39	** (10,00)	7,29 ± 4,95	(6,00)
Broj nezrelih oocita	4,87 ± 3,74	** (4,00)	2,82 ± 2,27	(2,00)
Debljina endometrijuma (mm)	10,62 ± 1,59	*** (11,00)	9,70 ± 1,09	(9,50)

*** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$ (Student t-test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test)

Dužina stimulacije je, statistički značajno duža kod pacijentkinja studijske grupe na dugoj šemi sa agonistima GnRH ($p < 0,001$), dok nema statistički značajne razlika u količini

gonadotropina koja je primenjena za stimulaciju ovulacije. Svi ostali parametri ovarijalnog odgovora pacijentkinja studijske grupe statistički su značajno veći kod pacijentkinja na dugoj šemi agonistima GnRH: broj zrelih i broj nezrelih jajnih ćelija na nivou statističke značajnosti $p < 0,01$, a broj folikula ≥ 16 mm viđenih UZ, broj aspiriranih oocita, debljina endometrijuma na nivou statističke značajnosti od $p < 0,001$. Karakteristike ovarijalnog odgovora date su u tabeli 16, a karakteristike aspiriranih jajnih ćelija prikazane su grafikonom 3.



Grafikon 3. Karakteristike jajnih ćelija pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na primenjeni protokol stimulacije

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me)) (Mann-Whitney test)

5.2.3. Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije

Ukupan broj zrelih jajnih ćelija veći je u studijskoj grupi ispitanica na protokolu antagonistima GnRH no kod ispitanica na dugom protokolu agonistima GnRH (72,09% vs 68,88%), a veća je i stopa fertilizacije (68,13% vs 65,39%), ali ne i statistički značajno. Srednji broj oplodjenih jajnih ćelija je statistički značajno veći kod pacijentkinja studijske grupe koje su bile na dugom protokolu agonistima GnRH ($p < 0,01$, Mann-Whitney test). Stopa fertilizacije veća je u grupi ispitanica kod kojih su primenjivani antagonisti GnRH, ali ne i statistički značajno (68,13% vs 65,39%).

Tabela 17. Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije kod pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na primenjeni protokol stimulacije

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima)

	Studijska grupa	
	Agonisti GnRH – duga n=78	Antagonisti GnRH n=45
Ukupan br. aspiriranih oocita	1205 (n=77)	455 (n=45)
Ukupan br. zrelih oocita	830 68,88%	328 72,09%
Ukupan br. nezrelih oocita	375 31,12% (n=76)	127 27,91% (n=43)
Ukupan br. oplođenih oocita	788	310
Srednji br. oplođenih oocita	10,37 ± 6,49 ** (10,00)	7,21 ± 4,81 (6,00)
Stopa fertilizacije	65,39% 788/1205	68,13% 310/454

** – $p < 0,01$ (χ^2 test, Mann-Whitney test)

5.2.4. Kvalitet embriona

Tabela 18. Embriološke karakteristike dobijenih embriona 3. dana pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na primenjeni protokol stimulacije

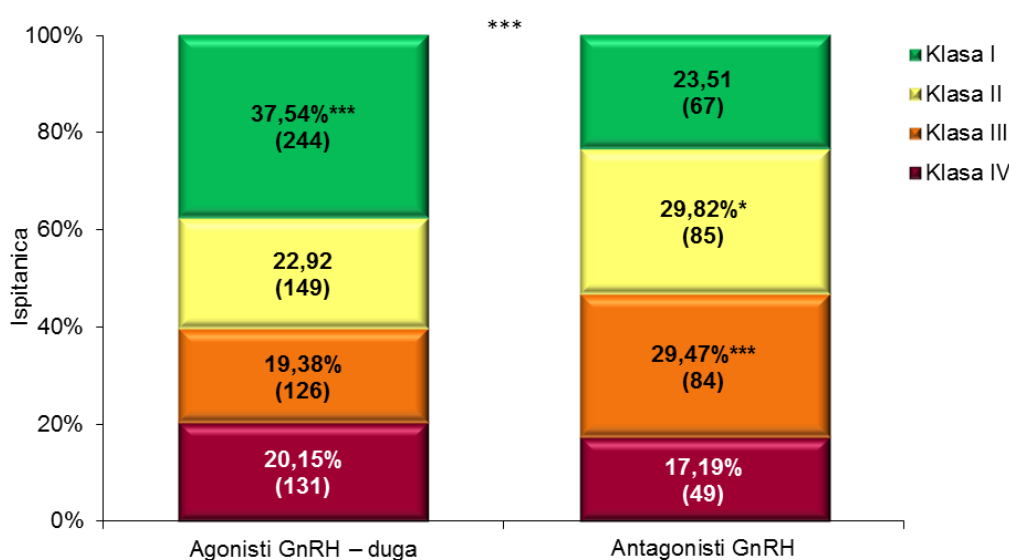
(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima i procentualno)

	Studijska grupa	
	Agonisti GnRH – duga n=75	Antagonisti GnRH n=42
Srednji broj dobijenih embriona	8,67 ± 4,94 * (8,00)	6,79 ± 4,25 (5,00)
Kvalitet dobijenih embriona ***		
Klasa I	244 37,54% ***	67 23,51%
Klasa II	149 22,92%	85 29,82% *
Klasa III	126 19,38%	84 29,47% ***
Klasa IV	131 20,15%	49 17,19%
Ukupan broj embriona	650	285

* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ (χ^2 test – poređenje zastupljenosti između grupa)

Na osnovu tabele kontigencije 4×2 kvalitet dobijenih embriona u studijskoj grupi statistički se značajno razlikuje u odnosu na tip primenjenog protokola ($p < 0,001$). U grupi ispitanica na dugom protokolu agonistima GnRH statistički je značajno zastupljenije učešće dobijenih embriona kvaliteta klase I u poređenju sa protokolom antagonistima GnRH ($p < 0,001$), dok je posledično veća zastupljenost embriona klase II ($p < 0,05$) i III ($p < 0,001$) u protokolu sa antagonistima.

Srednja vrednost broja dobijenih embriona statistički je značajno veća kod pacijentkinja studijske grupe na dugoj šemi agonistima ($p < 0,05$, Mann-Whitney test), i iskazana je u tabeli 18.



Grafikon 4. Procentualna zastupljenost dobijenih embriona 3.dana po klasama pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na primenjeni protokol stimulacije

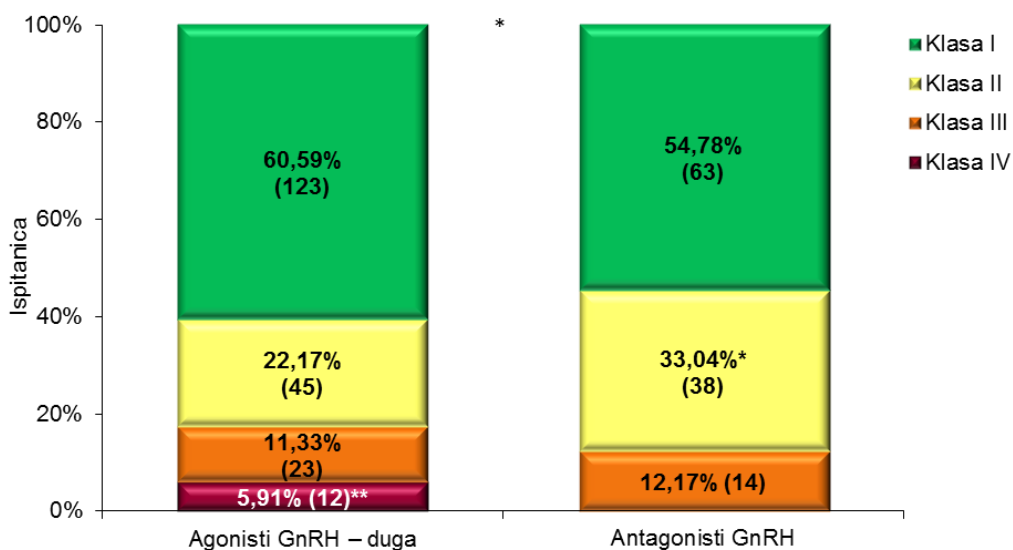
* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ (χ^2 test – poređenje zastupljenosti između grupa)

Na osnovu tabele kontigencije 4×2 kvalitet transferisanih embriona statistički se značajno razlikuje u studijskoj grupi, u odnosu na tip primenjenog protokola ($p < 0,05$). U grupi ispitanica na protokolu antagonistima statistički je značajno zastupljenije učešće dobijenih embriona kvaliteta klase II, u poređenju sa protokolom duge šeme agonistima ($p < 0,05$), dok je veća zastupljenost embriona klase IV u dugoj šemi agonistima ($p < 0,01$). Nama statistički značajne razlike u srednjem broju transferisanih embriona između pacijentkinja studijske grupe u odnosu na tip protokola.

Tabela 19. Embriološke karakteristike transferiranih embriona pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na primenjeni protokol stimulacije (vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima i procentualno)

	Studijska grupa	
	Agonisti GnRH – duga n=75	Antagonisti GnRH n=42
Srednji broj transferiranih embriona	2,71 ± 0,61 (3,00)	2,74 ± 0,54 (3,00)
Kvalitet transferiranih embriona*		
Klasa I	123 60,59%	63 54,78%
Klasa II	45 22,17%	38 33,04%*
Klasa III	23 11,33%	14 12,17%
Klasa IV	12 5,91%**	0 0,00%
Ukupan broj transferiranih embriona	203	115

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ (χ^2 test – poređenje zastupljenosti između grupa)



Grafikon 5. Procentualna zastupljenost transferiranih embriona po klasama pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na primenjeni protokol

*** – $p < 0,001$ (χ^2 test – poređenje zastupljenosti između grupa)

5.2.5. Uspeh VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od primenjenog protokola stimulacije

Tabela 20. Poređenje kliničke efikasnosti kod pacijentkinja sa PCOS-om
u odnosu na primenjeni protokol stimulacije
(vrednosti parametara su date apsolutnim brojevima i procentualno)

	Studijska grupa	
	Agonisti GnRH – duga n=78 sa ET n=75	Antagonisti GnRH n=45 sa ET n=42
Stopa implantacije	23,65% (48 vs 203)	20,87% (24 vs 115)
Ukupno trudnoća po ET (%)	38 50,67% (vs 75)	22 52,38% (vs 42)
Kliničkih trudnoća po ET (%)	36 48,00% (vs 75)	21 50,00% (vs 42)
Biohemijskih trudnoća po ET (%)	2 2,67% (vs 75)	1 2,38% (vs 42)
Stopa multifetalnih trudnoća	28,95% (vs 38)	9,09% (vs 23)
Broj multifetalnih trudnoća po ET	11 14,67% (vs 75)	2 4,76% (vs 42)
Dvojke	10 13,33% (vs 75)	1 2,38% (vs 42)
Trojke	1 1,33% (vs 75)	1 2,38% (vs 42)
Pobačaji po ET	6 8,00% (vs 75)	2 4,76% (vs 42)
Stopa pobačaja po klinič. trudnoć.	16,67% (vs 36)	9,52% (vs 21)
Otkazani ciklusi	3 3,85% (vs 78)	3 6,67% (vs 45)
Bez aspiriranih oocita	1 1,28%	0 0,00%
Bez oplodjenih oocita	1 1,28%	2 4,44%
Bez embriotransfera	1 1,28%	1 2,22%
OHSS	14 17,95%	3 6,67%
OHSS gradus I	12 15,38%	3 6,67%
OHSS gradus II	2 2,56%	0 0,00%

(n.s. – χ^2 test)

Stopa implantacije veća je pri dugom protokolu agonistima GnRH (23,65% vs 20,87%), ali ne i statistički značajno. Zastupljenost ispitanica studijske grupe kod kojih je ostvarena klinička trudnoća – 36 (48,00%), a koji je ostvaren u dugoj šemi agonistima GnRH, neznatno je manji u odnosu na protokol sa antagonistima GnRH – 21 (50,00%). U studijskoj grupi ispitanica koje su stimulirane dugim protokolom sa agonistima GnRH, veća je zastupljenost multifetalnih trudnoća (14,67% vs 4,76%, $p=0,1313$), kao i njihova stopa (njihov broj u odnosu na ukupan broj trudnoća, 28,95% vs 9,09%, $p=0,1050$), ali ne i statistički značajno u odnosu na ispitanice studijske grupe stimulirane protokolom sa antagonistima GnRH. U studijskoj grupi kod pacijentkinja tretiranih dugim protokolom agonistima, u odnosu na protokol antagonistima, veća je zastupljenost pobačaja (8,00% vs 4,76%), kao i stopa pobačaja (16,67% vs 9,52%), no ne i statistički značajno. Pri oba protokola bilo je po tri ispitanice sa otkazanim ciklusima, pa je stopa otkazanih ciklusa veća u protokolu sa antagonistima GnRH (6,67%), ali ne i statistički značajno u odnosu na dugi protokol sa agonistima GnRH (3,85%).

OHSS je zastupljeniji kod ispitanica studijske grupe kod kojih je primenjivan dugi protokol sa agonistima GnRH (17,95% vs 6,67%), ali ne i statistički značajno $p=0,0820$. OHSS gradusa I zastupljeniji je u studijskoj grupi pri dugom protokolu agonistima GnRH no pri protokolu antagonistima (15,35% vs 6,67%), ali ne i statistički značajno, dok je gradus II zastupljen samo kod dve ispitanice studijske grupe na dugom protokolu agonistima GnRH.

5.3. Uticaj upotrebe metformina na tok i ishod VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om

U grupi žena koje su imale policistični ovarijalni sindrom, terapiju metforminom koristilo je 69 (56,10%) pacijentkinja, dok je 54 (43,90%) bilo bez terapije.

5.3.1. Karakteristike ovarijalnog odgovora

Rezultati koji predstavljaju karakteristike ovarijalnog odgovora na stimulaciju ovulacije kod pacijentkinja sa PCOS-om, u zavisnosti od toga da li su koristile metformin ili ne, prikazani su u tabeli 21.

Tabela 21. Karakteristike ovarijalnog odgovora pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na upotrebu metformina

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me))

	Studijska grupa			
	Sa metforminom (n=69)		Bez metformina (n=54)	
Dužina stimulacije (br.dana)	$10,80 \pm 2,18^*$	(11,00)	$9,81 \pm 2,18$	(9,00)
Količina gonadotropina (IU)	$1691,12 \pm 517,10$	(1575,00)	$1561,81 \pm 539,67$	(1562,50)
Broj folikula ≥ 16 mm	$13,14 \pm 6,17$	(13,00)	$12,15 \pm 7,04$	(12,00)
Broj aspiriranih oocita	$14,06 \pm 7,89$	(13,00)	$12,78 \pm 7,38$	(10,50)
Broj zrelih oocita	$10,00 \pm 6,20$	(9,00)	$8,85 \pm 5,99$	(7,00)
Broj nezrelih oocita	$4,26 \pm 3,25$	(4,00)	$3,93 \pm 3,63$	(3,00)
Debljina endometrijuma (mm)	$10,58 \pm 1,44^{**}$	(10,50)	$9,90 \pm 1,47$	(9,50)

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ (Student t-test nezavisnih uzoraka i Mann-Whitney test)

Ukupna količina gonadotropina (IU) utrošena za stimulaciju ovulacije kod ispitanica koje su koristile metformin je ($1691,12 \pm 517,10$) IU uz medijanu od 1575,00, veća je u odnosu na ($1561,81 \pm 539,67$) sa medijanom od 1562,50, ali ne i statistički značajna. I svi ostali ispitivani parametri koji karakterišu ovarijalni odgovor (broj folikula ≥ 16 mm, broj aspiriranih oocita, broj zrelih i broj nezrelih oocita) veći su kod ispitanica koje su koristile metformin ali bez statističke značajnosti. Statistički značajno veće vrednosti bile su: dužina stimulacije u grupi pacijentkinja koje su koristile metformin ($10,80 \pm 2,18$) u odnosu na one bez metformina ($9,81 \pm 2,18$) ($p < 0,05$), i debljina endometrijuma ($p < 0,01$).

5.3.2. Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije

Učešće zrelih oocita u ukupnom broju aspiriranih oocita u obe grupe ponaosob statistički je češće od nezrelih ($p < 0,001$). Nema značajne razlike u zastupljenosti zrelih oocita između studijske grupe koja je koristila, i studijske grupe koja nije koristila metformin. Stopa fertilizacije slična je u obe grupe (66,39% vs 65,80%), i prikazana je u tabeli 22.

Tabela 22. Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije kod pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na upotrebu metformina

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima)

	Studijska grupa			
	Sa metforminom (n=69)		Bez metformina (n=54)	
Ukupan br. aspiriranih oocita	970		690	
		(n=68)		(n=51)
Ukupan br. zrelih oocita	680	70,10%	478	69,28%
Ukupan br. nezrelih oocita	290	29,90%	212	30,72%
Ukupan br. oplodjenih oocita	644		454	
Srednji br. oplodjenih oocita	$9,47 \pm 6,26$	(8,50)	$8,90 \pm 5,94$	(7,00)
Stopa fertilizacije	66,39%		65,80%	

(χ^2 test i Mann-Whitney test)

5.3.3. Kvalitet embriona

Tabela 23. Embriološke karakteristike dobijenih embriona 3. dana pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na upotrebu metformina

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima i procentualno)

	Studijska grupa			
	Sa metforminom (n=67)		Bez metformina (n=50)	
Srednji broj dobijenih embriona	$8,15 \pm 5,10$	(7,00)	$7,78 \pm 4,33$	(7,00)
Kvalitet dobijenih embriona				
Klasa I	178	32,60%	133	34,19%
Klasa II	126	23,08%	108	27,76%
Klasa III	123	22,53%	87	22,37%
Klasa IV	119	21,79% *	61	15,68%
Ukupan broj embriona	546		389	

* – $p < 0,05$ (χ^2 test vs studijska grupa bez metformina)

Poređenjem kvaliteta svih dobijenih embriona 3. dana, najviše embriona u obe ispitivane grupe je klase I, manji je broj embriona nižih klasa kvaliteta, te je najmanji procenat svih dobijenih embriona sa klasom IV. Na osnovu tabele kontingencije 4×2 (χ^2 test) nema

statistički značajne razlike u raspodeli embriona po kvalitetu. Poređenjem zastupljenosti embriona određenog kvaliteta, utvrđeno je da je više embriona klase IV kod pacijentkinja studijske grupe sa metforminom nego u grupi bez metformina ($p < 0,05$, χ^2 test).

Srednji broj dobijenih embriona u grupi PCOS pacijentkinja koje su koristile metformin bio je ($8,15 \pm 5,10$), a u grupi bez metformina bio je ($7,78 \pm 4,33$). Iako je njegova vrednost veća u grupi pacijentkinja koje su koristile metformin, nema statistički značajne razlike između grupa (Mann-Whitney test). Rezultati prikazani u tabeli 23.

Tabela 24. Embriološke karakteristike transferiranih embriona pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na upotrebu metformina

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima i procentualno)

	Studijska grupa	
	Sa metforminom (n=67)	Bez metformina (n=50)
Srednji broj transferiranih embriona	$2,66 \pm 0,47$ (3,00)	$2,80 \pm 0,40$ (3,00)
Kvalitet transferiranih embriona		
Klasa I	100 56,18%	86 61,43%
Klasa II	49 27,53%	34 24,29%
Klasa III	22 12,36%	15 10,71%
Klasa IV	7 3,93%	5 3,57%
Ukupan broj transferiranih embriona	178	140

U tabeli 24 prikazano je da obe ispitivane grupe imaju najviše embriona klase I kvaliteta. Takođe se zapaža tendencija manjeg broja embriona nižih klasa kvaliteta. Poređenjem studijske i kontrolne grupe Pearsonovim χ^2 testom, nije ustanovljena statistički značajna razlika između kvaliteta transferiranih embriona. Nema statistički značajne razlike u broju transferiranih embriona između grupa, i on se kretao između 2 i 3.

5.3.4. Uspeh VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od upotrebe metformina

Rezultati kliničke efikasnosti tj. uspeha vantelesnog oplođenja pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od korišćenja metformina prikazani su u tabeli 25.

U studijskoj grupi pacijentkinje sa PCOS-om koje su koristile metformin zastupljenost kliničkih trudnoća po ET, je veća (33, tj. 49,25%) u odnosu na ispitanice studijske koje nisu koristile metformin (24, tj. 48,00%); veća je pojava i biohemijskih trudnoća (2, tj.

2,99%) u odnosu na (1, tj. 2,00%). Kao posledica iznetog, veći je, ali ne i statistički značajno, ukupan broj trudnoća (kliničkih i biohemijskih) u grupi ispitanica studijske grupe koje su koristile metformin (35, tj. 52,24 u odnosu na 25, tj. 50,00%).

U istoj grupi je i veća i stopa implantacije (24,16% vs 20,71%), ali bez statistički značajne razlike u odnosu na studijsku grupu ispitanica koje nisu koristile metformin.

Tabela 25. Poređenje kliničke efikasnosti kod pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na upotrebu metformina

	Studijska grupa	
	Sa metforminom (n=69) (sa ET n=67)	Bez metformina (n=54) (sa ET n=50)
Stopa implantacije	24,16% (43 vs 178)	20,71% (29 vs 140)
Ukupno trudnoća po ET (%)	35 52,24% (vs 67)	25 50,00% (vs 50)
Kliničkih trudnoća po ET (%)	33 49,25% (vs 67)	24 48,00% (vs 50)
Biohemijskih trudnoća po ET (%)	2 2,99% (vs 67)	1 2,00% (vs 50)
Stopa multifetalnih trudnoća	25,71%	16,00%
Broj multifetalnih trudnoća po ET	9 13,43% (vs 67)	4 8,00% (vs 50)
Dvojke	8 11,94% (vs 67)	3 6,00% (vs 50)
Trojke	1 1,49% (vs 67)	1 2,00% (vs 50)
Pobačaji po ET	5 7,46% (vs 67)	3 6,00% (vs 50)
Stopa pobačaja po klinič. trudnoć.	15,15%	12,50%
Otkazani ciklusi	2 2,90% (vs 69)	4 7,41% (vs 54)
Bez dobijenih oocita	1 1,45%	0 0,00%
Bez oplodjenih oocita	0 0,00%	3 5,56%
Bez embriotransfera	1 1,45%	1 1,85%
OHSS	4 7,41% (vs 69)	13 18,84% (vs 54)
OHSS gradus I	3 5,56%	12 17,39% *
OHSS gradus II	1 1,85%	1 1,45%

* – $p < 0,05$, (χ^2 test)

U grupi u kojoj je primenjivan metformin, veća je zastupljenost multifetalnih trudnoća (13,43% vs 8,00%), kao i stopa multifetalnih trudnoća (25,71% vs 16,00%), ali ponovo bez statistički značajnih razlika. Isti je slučaj i sa zastupljenošću pobačaja u poređenim grupama (5, tj. 7,46% vs 3, tj. 6,00%), i stopama pobačaja (15,15% vs 12,50%).

Broj otkazanih ciklusa u odnosu na ukupan broj ispitanica, veći je u studijskoj grupi koja nije koristila metformin (4, tj. 7,41%) nego kod ispitanica studijske grupe koje su koristile metmorfin (1, tj. 2,90%).

Zastupljenost OHSS gradusa I (12, tj. 17,39%) je statistički značajno veća u studijskoj grupi bez metformina nego u grupi sa metmorfinom (3, tj. 5,56%) – $p < 0,05$.

5.4. Uticaj vrednosti AMH-a na tok i ishod vantelesnog oplodjenja kod pacijentkinja sa PCOS-om

U grupi pacijentkinja sa PCOS-om čije su vrednosti $AMH > 5$ ng/ml bilo je statistički značajno više žena, njih 82 (66,67%), dok je žena sa PCOS-om čije su vrednosti $AMH \leq 5$ ng/ml bilo duplo manje, tj. 41 (33,33%) – $p < 0,001$ (χ^2 test).

5.4.1. Karakteristike ovarijalnog odgovora

Karakteristike ovarijalnog odgovora na stimulaciju ispitanica sa policističnim ovarijalnim sindromom u zavisnosti od vrednosti AMH prikazane su u tabeli 26.

Tabela 26. Karakteristike ovarijalnog odgovora kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti AMH-a

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me))

	Studijska grupa					
	AMH > 5 ng/ml (n=82)			AMH ≤ 5 ng/ml (n=41)		
AMH (ng/ml)	8,41 ±	2,94	*** (7,80)	3,79 ±	1,23	(4,29)
Dužina stimulacije (br. dana)	10,41 ±	2,20	(10,00)	10,27 ±	2,30	(10,00)
Količina gonadotropina (IU)	1596,04 ±	506,73	(1500,00)	1710,98 ±	569,32	(1575,00)
Broj folikula ≥ 16 mm	13,22 ±	6,46	(12,50)	11,68 ±	6,71	(11,00)
Broj aspiriranih oocita	13,59 ±	8,39	(12,00)	13,32 ±	6,04	(13,00)
Broj zrelih oocita	9,54 ±	6,66	(8,00)	9,39 ±	4,93	(9,00)
Broj nezrelih oocita	4,21 ±	3,78	(3,00)	3,93 ±	2,56	(4,00)
Debljina endometrijuma (mm)	10,45 ±	1,45	(10,50)	9,94 ±	1,52	(10,00)

*** – $p < 0,01$ (Mann-Whitney test)

Vrednost AMH-a od ($8,41 \pm 2,94$) uz medijanu 7,80 statistički je značajno veća u odnosu na grupu u kojoj je $AMH \leq 5$ ng/ml, a iznosi ($3,79 \pm 1,23$) uz medijanu od 4,29 – $p < 0,001$.

Izuzev ukupne količine gonadotropina (IU) utrošene za ovarijalnu stimulaciju, sve ostale karakteristike ovarijalnog odgovora nešto su veće kod pacijentkinja sa PCOS-om čije su vrednosti $AMH > 5$ ng/ml, ali bez statistički značajnih razlika. Ukupna količina gonadotropina utrošena tokom stimulacije ovulacije kod PCOS pacijentkinja sa $AMH > 5$ ng/ml bila je ($1596,04 \pm 506,73$), dok je kod pacijentkinja sa vrednostima $AMH \leq 5$ ng/ml bila veća ($1710,98 \pm 569,32$), ali bez statističkog značaja.

5.4.2. Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije

Tabela 27. Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti AMH-a

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima)

	Studijska grupa			
	AMH > 5 ng/ml (n=82)		AMH ≤ 5 ng/ml (n=41)	
Ukupan br. aspiriranih oocita	1114		546	
	(n=81)		(n=41)	
Ukupan br. zrelih oocita	773	69,38%	385	70,51%
Ukupan br. nezrelih oocita	341	30,61%	161	29,49%
	(n=80)		(n=39)	
Ukupan br. oplodjenih oocita	739		359	
Srednji br. oplodjenih oocita	$9,24 \pm 6,70$	(7,00)	$9,21 \pm 4,75$	(9,00)
Stopa fertilizacije	66,34% 739/1114		65,75% 359/546	

(χ^2 test i Mann-Whitney test)

Učešće zrelih oocita u ukupnom broju aspiriranih oocita u obe grupe ponaosob, statistički je češće od nezrelih ($p < 0,001$). Zastupljenost zrelih jajnih ćelija veća je kod ispitanica studijske grupe kod koje je $AMH \leq 5$ ng/ml, ali neznatno veća u odnosu na grupu sa $AMH > 5$ ng/ml. Stopa fertilizacije je minimalno viša kod ispitanica studijske grupe sa $AMH > 5$ ng/ml (66,34 vs 65,75%). Ni ostali parametri kvaliteta jajnih ćelija prikazani u tabeli 27, nisu se bitnije razlikovali u odnosu na vrednosti AMH-a.

5.4.3. Kvalitet embriona

U studijskoj grupi pacijentkinja, u obe podgrupe u odnosu na vrednosti AMH-a, najviše dobijenih embriona je kvaliteta klase I, a manji je broj embriona nižih klasa kvaliteta, te je i u ovom slučaju najmanji procenat svih dobijenih embriona sa klasom IV. Na osnovu tabele kontigencije 4×2 (χ^2 test), između formiranih podgrupa nema statistički značajne razlike u raspodeli embriona po kvalitetu. Poređenjem zastupljenosti embriona određenog kvaliteta utvrđeno je da je više embriona kvaliteta klase II kod pacijentkinja studijske grupe sa AMH > 5ng/ml ($p < 0,05$, χ^2 test). Medijana kao mera centralne tendencije od 7 ista je u obe podgrupe, pa je srednji broj dobijenih embriona između podgrupa jednak.

Tabela 28. Embriološke karakteristike dobijenih embriona 3. dana kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti AMH-a

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima i procentualno)

	Studijska grupa	
	AMH > 5ng/ml (n=79)	AMH ≤ 5ng/ml (n=38)
Srednji broj dobijenih embriona	8,04 ± 5,28 (7,00)	7,89 ± 3,54 (7,00)
Kvalitet dobijenih embriona		
Klasa I	215 33,86%	96 32,00%
Klasa II	172 27,09% *	62 20,67%
Klasa III	135 21,26%	75 25,00%
Klasa IV	113 17,80%	67 22,33%
Ukupan broj embriona	635	300

* – $p < 0,05$ (χ^2 test vs studijska grupa AMH ≤ 5ng/ml)

Ni u pogledu kvaliteta transferiranih embriona nije bilo statističke značajnosti što je prikazano tabelom 29. Na osnovu tabele kontigencije 4×2, ali i poređenjem modaliteta kvaliteta ponaosob nije utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u raspodeli transferiranih embriona po kvalitetu između pacijentkinja studijske grupe u odnosu na vrednost AMH-a. Broj transferisanih embriona u obe podgrupe na osnovu medijane kao mere centralne tendencije je tri, te nema statistički značajne razlike ni u ovom pogledu.

Tabela 29. Embriološke karakteristike transferiranih embriona kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti AMH-a

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima i procentualno)

	Studijska grupa	
	AMH>5 ng/ml (n=79)	AMH≤5 ng/ml (n=38)
Srednji broj transferiranih embriona	2,63 ± 0,66 (3,00)	2,89 ± 0,31 (3,00)
Kvalitet transferiranih embriona		
Klasa I	120 57,69%	66 60,00%
Klasa II	60 28,85%	23 20,91%
Klasa III	21 10,10%	16 14,55%
Klasa IV	7 3,37%	5 4,55%
Ukupan broj transferiranih embriona	208	110

5.4.4. Uspeh VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti AMH-a

Rezultati kliničke efikasnosti tj. uspeha vantelesnog oplođenja kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti AMH-a prikazani su u tabeli 30.

Zastupljenost kliničkih trudnoća je veća u studijskoj grupi ispitanica sa AMH>5 ng/ml (40, tj. 50,63% po ET vs 17, tj. 44,74% po ET).

Stopa implantacija je viša kod ispitanica sa AMH>5 ng/ml, ali ne i statistički značajno (24,04 vs 20,00%). Stopa pobačaja je procentualno dosta veća, ali ne i statistički značajno kod ispitanica studijske grupe sa AMH≤5 ng/ml (17,65% vs 12,50%).

Ukupna zastupljenost OHSS-a (17,07% vs 7,32%), kao i samo gradusa I (14,63% vs 7,32%), procentualno je bitno, ali ne i statistički značajno, veća kod ispitanica studijske grupe sa AMH>5 ng/ml. OHSS gradusa II postoji kod dve ispitanice (2,44%) koje pripadaju grupi pacijentkinja sa AMH>5 ng/ml.

Tabela 30. Poređenje kliničke efikasnosti kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti AMH-a

	Studijska grupa	
	AMH>5 ng/ml (n=82) (sa ET n=79)	AMH≤5 ng/ml (n=41) (sa ET n=38)
Stopa implantacije	24,04% (50 vs 208)	20,00% (22 vs 110)
Ukupno trudnoća po ET (%)	42 53,16% (vs 79)	18 47,37% (vs 38)
Kliničkih trudnoća po ET (%)	40 50,63% (vs 79)	17 44,74% (vs 38)
Biohemijskih trudnoća po ET (%)	2 2,53% (vs 79)	1 2,63% (vs 38)
Stopa multifetalnih trudnoća	11,90%	16,67%
Broj multifetalnih trudnoća po ET	9 11,39% (vs 79)	4 10,53% (vs 38)
Dvojke	8 10,13% (vs 79)	3 7,89% (vs 38)
Trojke	1 1,27% (vs 79)	1 2,63% (vs 38)
Pobačaji po ET	5 6,33% (vs 79)	3 7,89% (vs 38)
Stopa pobačaja po klinič. trudnoć.	12,50%	17,65%
Otkazani ciklusi	3 3,66% (vs 82)	3 7,32% (vs 41)
Bez aspiriranih oocita	1 1,22%	0 0,00%
Bez oplođenih oocita	1 1,22%	2 4,88%
Bez embriotransfera	1 1,22%	1 2,44%
OHSS	14 17,07% (vs 82)	3 7,32% (vs 41)
OHSS gradus I	12 14,63%	3 7,32%
OHSS gradus II	2 2,44%	0 0,00%

Spirmanovim koeficijentom linearne korelacije AMH statistički značajno, negativno i srednjim intenzitetom koreliše sa ukupnom količinom gonadotropina ($p<0,01$), a malim intenzitetom i negativno statistički značajno koreliše sa godinama starosti ($p<0,05$), (tabela 31).

Tabela 31. Korelacije AMH-a (ρ – Spirmanov koeficijent linearne korelacije) sa BMI-om, godinama starosti ispitanica i ukupnom količinom gonadotropina

ρ	BMI (kg/m ²)	Godine starosti	Ukupno gonadotropina (IU)
AMH (ng/ml)	-0,093	-0,183*	-0,259**

* – $p<0,05$, ** – $p<0,01$

5.5. Uticaj BMI-a na tok i ishod VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om

Od ukupnog broja pacijentkinja sa PCOS-om vrednosti BMI>25 kg/m² imalo je 27 (21,95%) ispitanica, što je statistički značajno manje u odnosu na 96 pacijentkinja sa BMI≤25 kg/m² (p<0,001,χ² test).

5.5.1. Karakteristike ovarijalnog odgovora

BMI od (27,65±1,47) uz medijanu 28,00 statistički je značajno veća u odnosu na grupu u kojoj je BMI≤25 kg/m², a iznosi (22,08 ± 1,90) uz medijanu od 22,00 – p<0,001.

Ukupna količina gonadotroina i dužina stimulacija veće su u studijskoj grupi sa BMI>25 kg/m², ali bez statistički značajne razlike u odnosu na pacijentkinje studijske grupe sa BMI≤25 kg/m². Broj zrelih jajnih ćelija je izrazito veći u grupi pacijentkinja sa BMI≤25 kg/m², ali ipak samo blizu praga statističke značajnosti (p=0,0527).

Ostali parametri su bez statistički značajnih razlika i prikazani su u tabeli 32.

Tabela 32. Karakteristike ovarijalnog odgovora pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti BMI-a

(vrednosti parametara su date kao X±SD (Me))

	Studijska grupa	
	BMI>25 kg/m ² (n=27)	BMI≤25 kg/m ² (n=96)
BMI (kg/m ²)	27,65± 1,47 ^{***} (28,00)	22,08± 1,90 (22,00)
Dužina stimulacije (br. dana)	10,63 ± 2,20 (10,00)	10,29 ± 2,24 (10,00)
Količina gonadotropin (IU)	1759,72 ± 685,81 (1575,00)	1599,09 ± 474,09 (1550,00)
Broj folikula ≥16 mm	12,11 ± 7,89 (9,00)	12,88 ± 6,17 (12,00)
Broj aspiriranih oocita	11,48 ± 6,52 (11,00)	14,06 ± 7,89 (13,50)
Broj zrelih oocita	10,07 ± 6,33 (9,00)	7,44 ± 4,86 (6,00)
Broj nezrelih oocita	4,04 ± 3,68 (3,00)	4,14 ± 3,35 (3,00)
Debljina endometrijuma (mm)	9,89 ± 1,56 (10,00)	10,39 ± 1,46 (10,10)

^{***} – p<0,01 (Mann-Whitney test)

5.5.2. Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije

Učešće zrelih oocita u ukupnom broju aspiriranih oocita u obe grupe ponaosob, statistički je češće od nezrelih ($p < 0,001$). Zastupljenost zrelih jajnih ćelija je statistički veća kod ispitanica studijske grupe sa $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ ($p < 0,05$).

Srednji broj oplođenih jajnih ćelija takođe je statistički značajno veći kod pacijentkinja studijske grupe sa $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ ($p < 0,05$, Mann-Whitney test). I stopa fertilizacije je statistički značajno veća u ovoj grupi ispitanica (68,22% vs 57,10%) – $p < 0,001$ (tabela 33).

Tabela 33. Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednost BMI-a

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima)

	Studijska grupa			
	$BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ (n=27)		$BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ (n=96)	
Ukupan br. aspiriranih oocita	310		1350	
	(n=27)		(n=95)	
Ukupan br. zrelih oocita	201	64,84%	957	70,89% *
Ukupan br. nezrelih oocita	109	35,16%	393	29,11%
	(n=26)		(n=93)	
Ukupan br. oplođenih oocita	177		921	
Srednji br. oplođenih oocita	$6,81 \pm 4,73$	(5,00)	$9,90 \pm 6,30$	*(9,00)
Stopa fertilizacije	57,10%	177/310	68,22%	921/1350 ***

* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ (χ^2 test, Mann-Whitney test)

5.5.3. Kvalitet embriona

Embriološke karakteristike dobijenih embriona 3.dana prikazane su u tabeli 34. Na osnovu tabele kontigencije 4×2 utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u raspodeli dobijenih embriona po kvalitetu ($p < 0,001$). Ovo je posledica statistički značajno većeg broja najkvalitetnijih embriona klase I, u studijskoj grupi pacijentkinja sa $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ (36,13% vs 19,38%), odnosno statistički značajno manjeg broja embriona klase III (19,48% vs 36,88%) – $p < 0,001$. Medijana kao mera centralne tendencije od 7 u odnosu na 5, kao i srednje vrednost broja dobijenih embriona takođe su izrazito veći u grupi pacijentkinja studijske grupe $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$, ali zbog visokih vrednosti standardne devijacije ipak nema statistički značajne razlike ovog parametra između grupa, već je blizu praga statističke značajnosti ($p = 0,0584$, Mann-Whitney test).

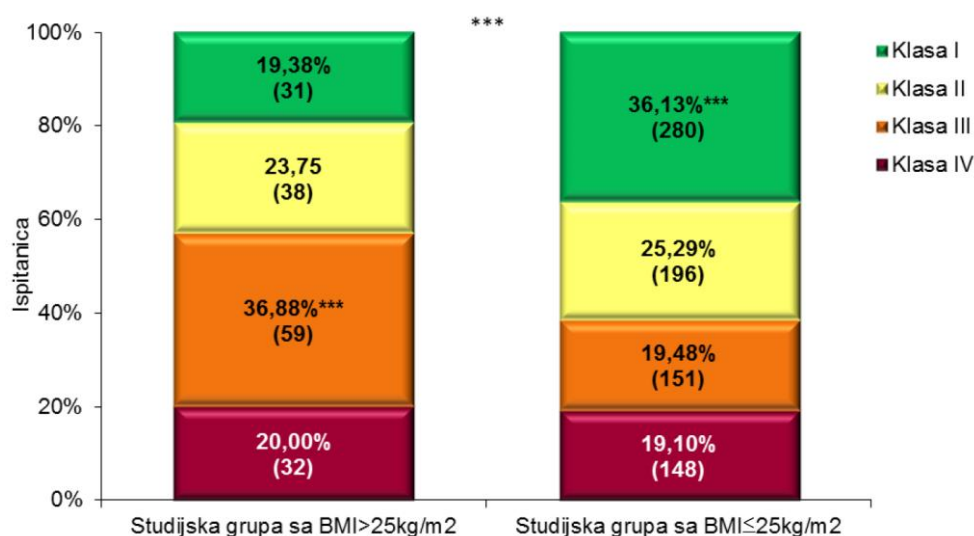
Tabela 34. Embriološke karakteristike dobijenih embriona 3.dana kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti BMI-a

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima i procentualno)

	Studijska grupa	
	BMI > 25 kg/m ² (n=25)	BMI ≤ 25 kg/m ² (n=92)
Srednji broj dobijenih embriona	6,40 ± 3,96 (5,00)	8,42 ± 4,90 (7,00)
Kvalitet dobijenih embriona ***		
Klasa I	31 19,38%	280 36,13% ***
Klasa II	38 23,75%	196 25,29%
Klasa III	59 36,88% ***	151 19,48%
Klasa IV	32 20,00%	148 19,10%
Ukupan broj embriona	160	775

*** – $p < 0,001$ (χ^2 test – poređenje zastupljenosti između grupa)

Procentualna zastupljenost dobijenih embriona po klasama 3.dana kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od BMI-a, prikazana je u grafikonu 6.



Grafikon 6. Procentualna zastupljenost dobijenih embriona po klasama kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti BMI-a

*** – $p < 0,001$ (χ^2 test – poređenje zastupljenosti između grupa)

Ova razlika u kvalitetu dobijenih embriona implicira da imamo statistički značajne razlike i u pogledu transferiranih embriona date u tabeli 35 i grafikonu 7.

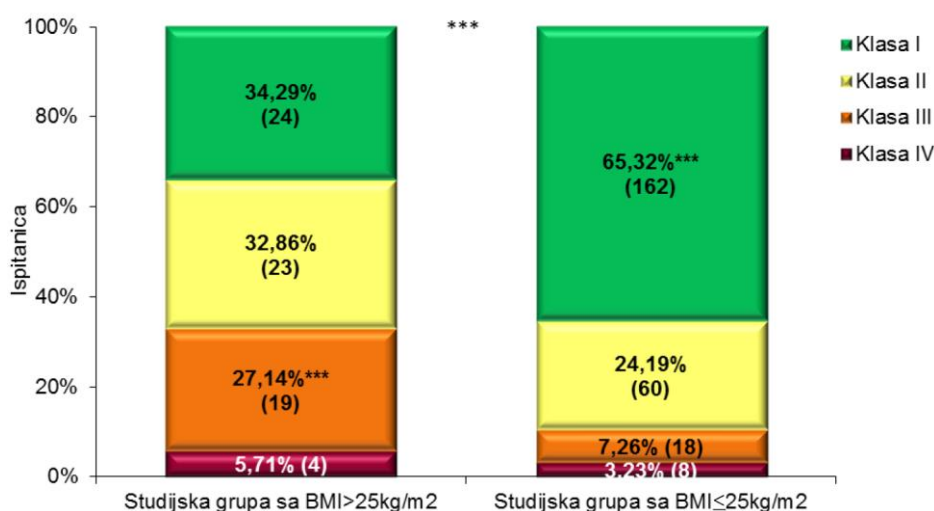
Tabela 35. Embriološke karakteristike transferiranih embriona kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti BMI-a

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima i procentualno)

	Studijska grupa	
	BMI > 25 kg/m ² (n=25)	BMI ≤ 25 kg/m ² (n=92)
Srednji broj transferiranih embriona	2,80 ± 0,50 (3,00)	2,70 ± 0,61 (3,00)
Kvalitet transferiranih embriona ^{***}		
Klasa I	24 34,29%	162 65,32% ^{***}
Klasa II	23 32,86%	60 24,19%
Klasa III	19 27,14% ^{***}	18 7,26%
Klasa IV	4 5,71%	8 3,23%
Ukupan broj transferiranih embriona	70	248

^{***} – p < 0,001 (χ^2 test – poređenje zastupljenosti između grupa)

Na osnovu tabele kontigencije 4×2 utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u raspodeli transferiranih embriona po kvalitetu (p < 0,001). Ovo je posledica statistički značajno većeg broja najkvalitetnijih transferiranih embriona klase I, u studijskoj grupi ispitanica sa BMI ≤ 25 kg/m² (65,32% vs 34,29%), odnosno statistički značajno manjeg broja embriona kvaliteta III (7,26% vs 27,14%) – p < 0,001. Nama statistički značajne razlike broja transferiranih embriona između pacijentkinja studijske grupe podeljenih na osnovu vrednosti BMI-a.



Grafikon 7. Procentualna zastupljenost transferiranih embriona po klasama kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti BMI-a

^{***} – p < 0,001 (χ^2 test – poređenje zastupljenosti između grupa)

5.5.4. Uspeh VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti BMI-a

Rezultati kliničke efikasnosti tj. uspeha vantelesnog oplođenja kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti BMI-a, prikazani su u tabeli 36.

Tabela 36. Poređenje kliničke efikasnosti kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od vrednosti BMI-a

(vrednosti parametara su date apsolutnim brojevima i procentualno)

	Studijska grupa	
	BMI>25 kg/m ² (n=27) sa ET n=25	BMI≤25 kg/m ² (n=96) sa ET n=92
Stopa implantacije	22,86% (16 vs 70)	24,19% (60 vs 248)
Ukupno trudnoća po ET (%)	12 48,00% (vs 27)	48 52,17% (vs 92)
Kliničkih trudnoća po ET (%)	12 48,00% (vs 27)	45 48,91% (vs 92)
Biohemijskih trudnoća po ET (%)	0 2,53% (vs 27)	3 3,26% (vs 92)
Stopa multifetalnih trudnoća	25,00% (vs 12)	20,83% (vs 48)
Broj multifetalnih trudnoća	3 12,00% (vs 25)	10 10,87% (vs 92)
Dvojke	2 8,00% (vs 25)	9 9,78% (vs 92)
Trojke	1 4,00% (vs 25)	1 1,09% (vs 92)
Pobačaji po ET	1 4,00% (vs 25)	7 7,61% (vs 92)
Stopa pobačaja po klinič. trudnoć.	8,33% (vs 12)	15,56% (vs 45)
Otkazani ciklusi	2 7,41% (vs 27)	4 4,17% (vs 96)
Bez aspiriranih oocita	0 0,00%	1 1,04%
Bez oplođenih oocita	1 3,70%	2 2,08%
Bez embriotransfera	1 3,70%	1 1,04%
OHSS	2 7,41% (vs 27)	15 15,63% (vs 96)
OHSS gradus I	1 3,70%	14 14,58%
OHSS gradus II	1 3,70%	1 1,04%

(n.s. – χ^2 test)

Stopa implantacije je niža, ali ne i statistički značajno. Kod ispitanica sa BMI>25 kg/m² iznosila je 22,86%, u odnosu na ispitanice sa BMI≤25 kg/m² kod kojih je bila 24,19%. Zastupljenost kliničkih trudnoća je slična kod pacijentkinja studijske grupe i sa BMI>25 kg/m² i BMI≤25 kg/m² (12, tj. 48,00% vs 45, tj. 48,91%). Stopa multifetalnih trudnoća je viša, ali ne i statistički značajno kod pacijentkinja studijske grupe sa BMI>25 kg/m² (25,00% vs 20,83%). Stopa pobačaja je procentualno bitno veća, ali ne i statistički značajno kod ispitanica studijske grupe sa BMI≤25 kg/m² (15,56% vs 8,33%).

Zastupljenost otkazanih ciklusa je viša kod pacijentkinja studijske grupe sa BMI>25 kg/m², ali ne i statistički značajno (7,41% vs 4,17%). Zastupljenost OHSS-a kod ispitanica studijske grupe sa BMI≤25 kg/m² procentualno je bitno, ali ne i statistički značajno, veća nego kod ispitanica sa BMI>25 kg/m² (15,63% vs 7,41%), kao i zastupljenost OHSS-a gradusa I (14,58% vs 3,70%), dok je po jedna ispitanica obe podgrupe imala OHSS gradusa II.

5.6. Uticaj godina starosti na tok i ishod VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om

5.6.1. Distribucija ispitanica po godinama starosti, BMI-u i hormonskom statusu

Od ukupnog broja pacijentkinja, njih 18 (14,63%) je bilo starije od 35 godina, odnosno statistički ih je značajno manje od onih do 35 godina kojih je bilo 105 (p<0,001, χ^2 test).

Tabela 37. Antropološki parametri ispitanica studijske grupe u zavisnosti od godina starosti (vrednosti parametara su date kao X±SD (Me))

Parametar	Studijska grupa	
	Godine >35, n=18	Godine ≤35, n=105
Godine starosti	38,11 ± 1,53 ^{***} (38,50)	30,52 ± 3,22 (31,00)
BMI (kg/m ²)	24,17 ± 2,36 (24,00)	23,16 ± 3,01 (23,00)

*** – p<0,01 (Mann-Whitney test)

Nema statistički značajne razlike u BMI između ispitanica studijske grupe do i preko 35 godina.

Tabela 38. Bazalne vrednosti hormona ispitanica studijske grupe u zavisnosti od godina starosti (vrednosti parametara su date kao X±SD (Me))

Parametar	Studijska grupa	
	Godine >35, n=18	Godine ≤35, n=105
FSH (mIU/ml)	5,33 ± 1,64 (5,05)	5,44 ± 1,75 (5,10)
LH (mIU/ml)	8,18 ± 3,62 (7,20)	6,90 ± 2,68 (6,70)
AMH (ng/ml)	4,72 ± 2,50 (4,91)	7,24 ± 3,31 ^{**} (11,00)
LH/FSH	1,61 ± 0,76 (1,51)	1,41 ± 0,79 (1,19)

*** – p<0,01 (Mann-Whitney test)

Kod pacijentkinja studijske grupe do 35 godina starosti statistički je značajno veća vrednost AMH-a u odnosu na pacijentkinje preko 35 godina (p<0,01).

5.6.2. Karakteristike ovarijalnog odgovora

Tabela 39. Karakteristike ovarijalnog odgovora kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od godina starosti (vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me))

	Studijska grupa			
	Godine >35, n=18		Godine ≤35, n=105	
Dužina stimulacije (br. dana)	9,83 ± 1,38	(10,00)	10,46 ± 2,33	(10,00)
Količina gonadotropina (IU)	1891,67 ± 678,34	* (1850,00)	1590,24 ± 489,37	(1550,00)
Broj folikula ≥16 mm	13,06 ± 7,15	(11,00)	12,65 ± 6,49	(12,00)
Broj aspiriranih oocita	15,61 ± 7,55	(15,00)	13,13 ± 7,66	(12,00)
Broj zrelih oocita	10,78 ± 6,94	(10,50)	9,27 ± 5,97	(8,00)
Broj nezrelih oocita	4,83 ± 4,11	(4,00)	3,99 ± 3,29	(3,00)
Debljina endometrijuma (mm)	10,18 ± 1,42	(10,25)	10,30 ± 1,51	(10,00)

* – $p < 0,05$ (Mann-Whitney test)

Dužina stimulacije veća je kod pacijentkinja studijske grupe do 35 godina, ali ne i statistički značajno u odnosu na pacijentkinje starije od 35 godina.

Ukupna količina gonadotropina (IU) kod pacijentkinja studijske grupe koje su starije od 35 godina, (1891,67±678,34 IU) uz medijanu od 1850,00 statistički je značajno veća u odnosu na količinu kod ispitanica studijske grupe koje su starosti do 35 godina, (1590,24±489,37 IU) sa medijanom od 1550,00, ali ne i statistički značajno veći ($p < 0,05$).

Broj folikula ≥16 mm viđen UZ, broj aspiriranih oocita, zrelih i nezrelih jajnih ćelija veći su kod pacijentkinja starijih od 35 godina, a debljina endometrijuma kod pacijentkinja do 35 godina, ali bez statistički značajnih razlika.

5.6.3. Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije

Ukupan broj zrelih jajnih ćelija minimalno je veći u studijskoj grupi pacijentkinja do 35 godina, a veća je i stopa fertilizacije, no bez statistički značajnih razlika.

Učešće zrelih oocita u ukupnom broju aspiriranih oocita u obe grupe ponaosob statistički je češće od nezrelih ($p < 0,001$), a nema značajne razlike u zastupljenosti zrelih oocita između ispitanica studijske grupe do i preko 35 godina starosti.

Tabela 40. Kvalitet jajnih ćelija i uspeh fertilizacije kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od godina starosti

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima)

	Studijska grupa			
	Godine >35, n=18		Godine ≤35, n=105	
Ukupan br. aspiriranih oocita	1205		455	
	(n=18)		(n=104)	
Ukupan br. zrelih oocita	194	69,04%	964	69,91%
Ukupan br. nezrelih oocita	87	30,96%	415	30,09%
	(n=18)		(n=101)	
Ukupan br. oplođenih oocita	177		921	
Srednji br. oplođenih oocita	9,83 ± 7,40	(8,50)	9,12 ± 5,88	(8,00)
Stopa fertilizacije	62,99%	177/281	66,79%	921/1379

(χ^2 test, Mann-Whitney test)

Srednji broj oplođenih jajnih ćelija je veći kod pacijentkinja studijske grupe starijih od 35 godina, ali ne i statistički značajno u odnosu na pacijentkinje do 35 godina.

5.6.4. Kvalitet embriona

Tabela 41. Embriološke karakteristike dobijenih embriona 3. dana kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od godina starosti

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima i procentualno)

	Studijska grupa			
	Godine >35, n=17		Godine ≤35, n=100	
Srednji broj dobijenih embriona	8,53 ± 4,81	(7,00)	7,90 ± 4,78	(7,00)
Kvalitet dobijenih embriona*				
Klasa I	59	40,69% *	252	31,90%
Klasa II	41	28,28%	193	24,43%
Klasa III	23	15,86%	187	23,67% *
Klasa IV	22	15,17%	158	20,00%
Ukupan broj embriona	145		790	

*** – $p < 0,001$ (χ^2 test – poređenje zastupljenosti između grupa)

Evidentno je da je u obe starosne grupe najveća zastupljenost dobijenih embriona sa klasom I, a broj embriona se smanjuje sa opadanjem kvaliteta, ali na osnovu tabele kontigencije 4×2 postoji statistički značajna razlika u raspodeli dobijenih embriona po kvalitetu između formiranih starosnih grupa ($p < 0,05$). Zastupljenost dobijenih embriona klase I statistički je značajno veća kod ispitanica starosti preko, a klase III starosti do 35 godina ($p < 0,05$).

Srednja vrednost broja dobijenih embriona veća je kod pacijentkinja studijske grupe starijih od 35 godina, ali ne i statistički značajno u odnosu na pacijentkinje do 35 godina.

Tabela 42. Embriološke karakteristike transferiranih embriona kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od godina starosti

(vrednosti parametara su date kao $X \pm SD$ (Me), a kategorijske varijable apsolutnim brojevima i procentualno)

	Studijska grupa	
	Godine >35, n=17	Godine ≤35, n=100
Srednji broj transferiranih embriona	2,94 ± 0,24 (3,00)	2,68 ± 0,62 (3,00)
Kvalitet transferiranih embriona		
Klasa I	31 62,00%	155 57,84%
Klasa II	12 24,00%	71 26,49%
Klasa III	6 12,00%	31 11,57%
Klasa IV	1 2,00%	11 4,10%
Ukupan broj transferiranih embriona	50	243

Na osnovu tabele kontigencije 4×2, ali ni poređenjem modaliteta klasa ponaosob, nije utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u raspodeli transferiranih embriona po kvalitetu. I u slučaju transferiranih embriona nešto je bolji kvalitet embriona u studijskoj grupi ispitanica starosti preko 35 godina. Nama statistički značajne razlike u srednjem broja transferiranih embriona između pacijentkinja studijske grupe u odnosu na starosnu grupu.

5.6.5. Uspeh VTO-a kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od godina starosti

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 43, zastupljenost kliničkih trudnoća (51%, tj. 51,00% vs 6, tj. 35,29%), biohemijskih (3, tj. 3,00% vs 0), kao i ukupan broj trudnoća (54, tj. 54,00% vs 6, tj. 35,29% po ET) i stopa implantacije (25,51% vs 20,00%), veći su kod ispitanica studijske grupe starosti do 35 godina, ali ne i statistički značajno u odnosu na ispitanice starosti preko 35 godina.

Tabela 43. Poređenje kliničke efikasnosti kod pacijentkinja sa PCOS-om u zavisnosti od godina starosti

(vrednosti parametara su date apsolutnim brojevima i procentualno)

	Studijska grupa	
	Godine >35, n=18 sa ET n=17	Godine ≤35, n=105 sa ET n=100
Stopa implantacije	20,00% (10 vs 50)	25,51% (62 vs 243)
Ukupno trudnoća po ET (%)	6 35,29% (vs 17)	54 54,00% (vs 100)
Kliničkih trudnoća po ET (%)	6 35,29% (vs 17)	51 51,00% (vs 100)
Biohemijskih trudnoća po ET (%)	0 0,00% (vs 17)	3 3,00% (vs 100)
Stopa multifetalnih trudnoća	66,67%* 4 vs 6	16,67% 9 vs 54
Broj multifetalnih trudnoća	4 23,53% (vs 17)	9 9,00% (vs 100)
Dvojke	4 23,53% (vs 17)	7 7,00% (vs 100)
Trojke	0 1,49% (vs 17)	2 2,00% (vs 100)
Pobačaji po ET	0 0,00% (vs 17)	8 8,00% (vs 100)
Stopa pobačaja po klinič. trudnoć.	0,00% (vs 6)	15,69% (vs 51)
Otkazani ciklusi	1 5,56% (vs 18)	5 4,76% (vs 105)
Bez aspiriranih oocita	0 0,00%	1 0,95%
Bez oplođenih jajnih ćelija	0 0,00%	3 2,86%
Bez transferiranih embriona	1 5,56%	1 0,95%
OHSS	4 22,22%	13 12,38%
OHSS gradus I	4 22,22%	11 10,48%
OHSS gradus II	0 0,00%	2 1,90%

* – p<0,05 (Mann-Whitney test)

U studijskoj grupi ispitanica starijih od 35 godina veća je zastupljenost multifetalnih trudnoća (23,53% vs 9,00%), bez statistički značajne razlike, ali je stopa multifetalnih trudnoća statistički značajno veća kod ovih ispitanica (66,67% vs 16,67%) – p<0,05.

Zastupljenost pobačaja u poređenim grupama (8, tj. 8,00% vs 0), kao i stopa pobačaja (15,69% vs 0%), veći su kod ispitanica starosti do 35 godina.

Broj otkazanih ciklusa u odnosu na ukupan broj ispitanica, veći je u studijskoj grupi ispitanica starijih od 35 godina, li ne i statistički značajno u odnosu na ispitanice starosti do 35 godina (1, tj. 5,56% vs 5, tj. 4,76%).

OHSS je zastupljeniji kod ispitanica studijske grupe koje su starije od 35 godina (22,22% vs 12,38%), ali ne i statistički značajno (p=0,2736). Veća je zastupljenost i OHSS

gradusa I u navedenoj grupi, a gradus II je zastupljen samo kod dve ispitanice studijske grupe koje su do 35 godina starosti.

Tabela 44. Vrednosti OR za procenu uticaja faktora od interesa na pojavu kliničke trudnoće u studijskoj grupi ispitanica. Rezultati univarijantne logističke regresione analize.

	OR	95,0% IP		p
		Donja	Gornja	
Godine starosti	0,99	0,91	1,09	0,9050
BMI	1,00	0,88	1,13	0,9896
AMH	1,04	0,93	1,16	0,4963
Upotreba metformina	1,05	0,51	2,19	0,8932
Protokol stimulacije	1,08	0,51	2,31	0,8355
Količina gonadotropina	1,00	1,00	1,00	0,6149
Debljina endometrijuma	1,06	0,83	1,35	0,6311
Br. aspiriranih oocita	0,99	0,95	1,04	0,8026
Br. zrelih oocita	0,97	0,91	1,03	0,3267
Br. nezrelih oocita	1,07	0,96	1,19	0,2394
Br. oplođenih jajnih ćelija	0,97	0,92	1,04	0,4091
Br. dobijenih embriona	0,99	0,92	1,07	0,7700
Br. dobij. embriona kvaliteta I klase	1,08	0,95	1,22	0,2498
Br. dobij. embriona kvaliteta II klase	1,01	0,83	1,24	0,9176
Br. dobij. embriona kvaliteta III klase	0,98	0,82	1,17	0,8323
Br. dobij. embriona kvaliteta IV klase	0,79	0,64	0,98	*0,0291
Br. transferiranih embriona	1,96	0,96	4,00	0,0634
Br. transfer. embriona kvaliteta I klase	1,51	1,08	2,10	*0,0146
Br. transfer. embriona kvaliteta II klase	0,84	0,55	1,31	0,4494
Br. transfer. embriona kvaliteta III klase	0,63	0,34	1,17	0,1433
Br. transfer. embriona kvaliteta IV klase	0,83	0,33	2,10	0,6978
BMI >25 kg/m ²	0,96	0,40	2,34	0,9355
AMH >5	1,27	0,58	2,76	0,5505
Starost >35 godina	0,52	0,18	1,53	0,2362

* – p<0,05

Na osnovu rezultata univarijantne regresione analize statistički značajni parametri od interesa za nastanak kliničke trudnoće su broj dobijenih embriona kvaliteta IV klase, i broj transferisanih embriona kvaliteta I klase p<0,05.

Povećanje broja dobijenih embriona za jedan dovodi do smanjenje verovatnoće za ostvarivanje kliničke trudnoće za 21%, uz interval poverenja od 2 do 36%. Povećanje broja transferisanih embriona kvaliteta klase I dovodi do porasta verovatnoće za kliničku trudnoću za 51%, uz interval poverenja od 8 do 110%.

Značajne prediktorske varijable iz univarijantne analize uvrštene su u model multivarijantne logističke regresije.

Tabela 45. Vrednosti OR za procenu uticaja faktora od interesa na pojavu kliničke trudnoće u studijskoj grupi ispitanica. Rezultati multivarijantne logističke regresione analize.

	OR	95,0% IP		p
		Donja	Gornja	
Br. dobij. embriona kvaliteta IV klase	0,79	0,64	0,98	*0,0293
Br. transfer. embriona kvaliteta I klase	1,52	1,08	2,12	*0,0155
Constant	0,69			0,3098

* – $p < 0,05$, $R^2 = 0,126$

I u modelu multivarijantne logističke regresione analize, kao statistički značajni parametri za nastanak kliničke trudnoće jesu broj dobijenih embriona kvaliteta IV klase i broj transferisanih embriona kvaliteta I klase, koji utiču na nastanak kliničke trudnoće na način već opisan pri univarijantnoj analizi ($p < 0,05$). Ovakav model uz konstantu regresije uslovljava 12,6% promena verovatnoće za nastanak kliničke trudnoće.

6. DISKUSIJA

Policistični ovarijalni sindrom je još uvek jedno od najkontraverznijih i nedovoljno istraženih područja u reproduktivnoj medicini. Infertilitet povezan sa anovulacijom, kliničkim manifestacijama, iregularnim menstrualnim ciklusima ili amenorejom i gojaznošću predstavlja značajan problem žena sa PCOS-om u reproduktivnom dobu.

U osnovi mehanizma neplodnosti u sindromu policističnih jajnika su smanjena mogućnost ovulacije i hipersekrecija LH-a. Možućnost ovulacije u PCOS-u determinišu telesna težina, nivo androgena i nivo insulina. Kod gojaznih pacijentkinja postoji izraženija hiperandrogenemija i hiperinsulinemija. Uz nižu koncentraciju SHBG-a, koji negativno korelira sa telesnom težinom, povišen je slobodni biološki aktivni testosteron. Ukoliko je izraženija klinička slika PCOS-a (gojaznost, amenoreja, hiperandrogenizam), manja je mogućnost ovulacije. Koncentracija testosterona u serumu direktno je i kvantitativno u korelaciji sa stepenom ovulatorne disfunkcije.

Pretpostavlja se da je anovulacija u PCOS-u posledica: 1. primarnog defekta u hipotalamusno-hipofiznoj osovini; i 2. neadekvatnog mehanizma povratne sprege koji izazivaju estrogene nastali perifernom konverzijom androgena. Konstantan priliv estrogena iz ekstraglandularnog izvora nadvladava ciklične promene u nivou estrogena koji normalno, mehanizmom povratne sprege, reguliše cikličnu sekreciju gonadotropina. Više od polovine produkcije estrona u ovom sindromu potiče od periferne konverzije ekcesivne količine androstenediona, a ova konverzija kvantitativno zavisi od telesne težine. Ovaj ekstraglandularni izvor estrogena etiološki je najznačajniji za održavanje hronične anovulacije. Tako, dodatna produkcija estrogena koja nije pod direktnom kontrolom gonadotropina, maskira ciklične signale povratnog dejstva estrogena, a posledica je aciklično oslobađanje gonadotropina i hronična anovulacija, bez konkretnog poremećaja unutar hipotalamusno-hipofizno-ovarijalne osovine. Ovaj viši nivo estrogena povećava i osetljivost hipofize na GnRH, što je uzrok prenaplašenog pulzativnog oslobađanja LH-a kod ovih žena.

Asistirana reproduktivna tehnika, gde spada i VTO, predstavljaju jednu od alternativa tretmana infertiliteta PCOS pacijentkinja. Glavne indikacije za IVF i ICSI metode tretmana infertiliteta PCOS pacijentkinja su: dugo trajanje neplodnosti, neuspeh do tada primenjenog lečenja kao i pridodati drugi faktori neplodnosti (tubarni, muški, ostali).

Sve ispitane pacijentkinje u nešem istraživanju bile su u starosnoj dobi od 23 do 40 godina. Analiziranjem starosne strukture, prosečna starost u ispitivanoj grupi bila je 31,63

(SD±4,05) godina, dok su pacijentkinje u kontrolnoj grupi bile statistički značajno starije. Prosečna starost pacijentkinja kontrolne grupe bila je 34,35 (SD±3,85) godine. Swanton i saradnici, ispitujući ishod IVF kod žena sa PCOS-om, PCO i normalnom morfologijom jajnika, su zabeležili da su ispitanice sa PCOS-om bile značajno mlađe u odnosu na one sa normalnom morfologijom jajnika⁸. Bez obzira na dobijenu statistički značajnu razliku u godinama života među pacijentkinjama sa PCOS-om, i pacijentkinjama sa tubarnim uzročnikom infertiliteta, mišljenja smo da ona nema uticaj na sam tok i krajnji ishod vantelesnog oplođenja, jer je najveći broj ispitanica bio u starosnoj dobi između 30 i 35 godina. Yan i saradnici su u svojoj studiji sprovedenoj na 11.830 IVF-ET ciklusa, ispitivali efekat godina žene na ishod IVF-a i ET-a, i došli do rezultata da se kvalitet embriona nije razlikovao po starosnim grupama, kao i da se sa godinama smanjuje procenat kliničkih trudnoća, ali da je taj procenat statistički značajan kod pacijentkinja preko 35 godina, kada je povećana i stopa pobačaja¹⁷¹. Smatramo da je razlika u godinama prisutna jer su pacijentkinje sa PCOS-om, zbog prisustva oligo-anovulatornog razloga infertiliteta, ranije tražile pomoć ginekologa radi ostvarivanja svoje reproduktivne funkcije, dok su normoovulatorne pacijentkinje sa tubarnim uzrokom steriliteta znatno kasnije tražile pomoć ginekologa i pristupale VTO-u kao metodi lečenja. Značajan broj pacijentkinja sa prohodnim jednim jajovodom gaji nadu spontanog začeća, što u praksi zna da potraje jako dugo.

Iako je PCOS često udružen sa insulinskom rezistencijom i debljinom, mi nismo pronašli statistički značajnu razliku u BMI-u među pacijentkinjama sa PCOS-om i pacijentkinjama koje su imale tubarni factor infertiliteta. Medijana za BMI u obe grupe iznosila je 23 kg/m². Mulders i saradnici takođe nisu pronašli značajnu razliku u BMI-u ispitujući IVF ishod kod anovulatornog infertiliteta, uključujući policistični ovarijalni sindrom u poređenju sa tubarnim faktorom infertiliteta¹⁷².

Određivanjem bazalnih vrednosti hormona 3. dana menstrualnog ciklusa, želeli smo da pokažemo razliku u hormonalnom miljeu između pacijentkinja sa PCOS-om i tubarnim faktorom infertiliteta. Hipersekrecija LH-a i androgena sa normalnom ili smanjenom koncentracijom FSH-a predstavljaju standardni nalaz PCOS-a. Skladno tome su i dobijene signifikantno veće koncentracije LH hormona u krvi pacijentkinja sa PCOS-om, dok je koncentracija FSH-a bila značajno veća u kontrolnoj grupi. Poznato je da androgeni dovode do proliferacije ćelija granuloze u kojima se pojačano stvara AMH koji dodatno povećava LH. Vrednosti AMH-a koje se luče iz velikog broja malih folikula policističnih jajnika su dva do tri puta više nego kod normalnih jajnika pa je srednja vrednost AMH-a kod pacijentkinja sa PCOS-om bila 6,87 (SD±3,32) ng/ml a u kontrolnoj grupi 1,76 (SD±1,19) ng/ml. Balen i

saradnici su sugerisali da su povišeni nivoi LH-a u PCOS-u povezani sa povećanom stopom pobačaja¹⁶⁸. Tada je predloženo da se upotrebom GnRH agonista, koja dovodi do supresije LH-a, smanji ovaj rizik¹⁶⁹. Ova hipoteza je kasnije osporena od strane Imanija i saradnika, 1999. i Narda i saradnika, 2002. godine^{173,174}.

Trajanje stimulacije u broju dana se nije razlikovalo, i medijana za obe grupe ispitanica iznosila je 10. Kod pacijentkinja sa PCOS-om, zbog prenatrženog odgovora i povećanog rizika od razvoja OHSS-a, sa stimulacijom gonadotropinima kretalo se oprezno, uz primenu „step up” protokola. Žene sa policističnim ovarijumima zahtevaju manje doze gonadotropina od žena sa normalnim jajnicima¹⁷⁵. Pojačana senzitivnost i odgovor ovarijuma na egzogenu primenu gonadotropina kod PCOS pacijentkinja, opisana je i od strane više autora^{103,176}. U našem istraživanju ukupno je statistički značajno više gonadotropina (2408,24±910,48 IU) utrošeno u kontrolnoj grupi u odnosu na ispitivanu grupu (1634,35±528,88 IU). Kao posledica pojačane senzitivnosti dolazi do razvoja većeg broja folikula, povišenog estradiolskog odgovora i rizika od nastanka OHSS-a. Više istraživača je opisalo povećano lučenje estradiola od strane granulosa-ćelija u *in vitro* kulturama ćelija PCOS pacijentkinja^{177,178}.

Vrednost estradiola 6. dana stimulacije bile su veće u ispitivanoj grupi, što je verovatno povezano sa većim brojem folikula, ali nije bilo statističke značajnosti. Pacijentkinje sa PCOS-om imaju više vrednosti estradiola u poređenju sa pacijentkinjama koje imaju normalnu funkciju jajnika¹⁷⁹. Nivo estradiola je dobar indikator rizika za razvoj OHSS-a, veći nivo estradiola veći je i rizik od OHSS-a. Nažalost, mi nismo bili u mogućnosti da merimo nivo estradiola sve do dana administracije hCG injekcije u cilju praćenja ovarijalne stimulacije, već smo se oslanjali na ultrazvučno praćenje rasta folikula. Debljina endometrijuma, takođe, ima dobru korelaciju sa nivoom estradiola¹⁸⁰. Debljina endometrijuma statistički je značajno bila veća kod pacijentkinja sa PCOS-om, u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$).

Heijnen i saradnici su u svojoj meta-analizi iz 2006. godine ispitujući ishod klasičnog IVF-a kod žena sa PCOS-om, primetili povećan broj dobijenih oocita u PCOS grupi u poređenju sa kontrolnom grupom, gde je uzrok infertiliteta bio tubarni faktor, ali je stopa fertilizacije bila veća u kontrolnoj grupi, pa je ukupni broj fertilizovanih oocita u obe grupe bio jednak¹⁶⁵. Mnoge objavljene studije su pokušale da objasne moguć razlog za ovo zapažanje. Jedna studija zaključila je da se broj zdravih ne-atretičnih folikula verovatno ne povećava kod žena sa PCOS-om, zato što je normalan nivo inhibina B, koga proizvode preantralni i mali antralni folikuli, pronađen u PCOS pacijentkinja¹⁸¹. Druga studija poredila je kvalitet oocita pre ICSI metode, posle odbacivanja kumulusnih ćelija kod PCOS i ne-

PCOS pacijentkinja⁹. Ova studija nije pokazala statistički značajnu razliku u stopi MII oocita, stopi germinalnih vezikula i stopi fertilizacije između grupa. Ovo pronalaženje nam govori da treba uključiti citoplazmatske faktore umesto uključivanja nuklearne zrelosti. Sengoku i saradnici su istraživali hromozomske normalnosti u nefertilizovanih oocita PCOS pacijentkinja, i pacijentkinja sa tubarnim infertilitetom. Iako bez značajnih razlika u stopi aneuploidija između grupa, zapažena je smanjena stopa oplodnje u PCOS grupi. Autori su zaključili da smanjena stopa fertilizacije nije zbog hromozomskih aberacija ili nezrelosti oocita, već dolazi iz pacijenata sa PCOS zbog lošeg hormonskog miljea¹⁸².

Više objavljenih studija iznose rezultate o povećanoj produkciji folikula i jajnih ćelija, a o manjoj stopi fertilizacije pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na kontrolnu grupu^{104,183,184}.

Broj folikula ≥ 16 mm viđenih ultrazvukom, broj aspiriranih oocita i broj zrelih oocita u našem istraživanju bio je statistički značajno veći u ispitivanoj grupi ($p < 0,001$). Zapažen je signifikantno veći broj dobijenih oocita i u drugim studijama^{185,186,187}. U našem uzorku pacijentkinja sa PCOS-om, dobijeno je 69,76% zrelih jajnih ćelija, što je statistički značajno manje u poređenju sa kontrolnom grupom, gde je dobijeno 76,02% zrelih oocita. PCOS pacijentkinje stimulisane u programu IVF-a, imaju veći procenat imaturnih oocita nego normoovulatorne žene^{9,116,170}. I u našem istraživanju, broj nezrelih jajnih ćelija statistički je bio značajno veći u ispitivanoj grupi ($p < 0,001$), ali nije bilo statistički značajne razlike u stopi učešća nezrelih oocita u ukupnom broju aspiriranih oocita među grupama. Plachot i saradnici su 2003. godine objavili da je kod žena sa PCOS-om dobijeno signifikantno više oocita, kao i da je signifikantno bio veći procenat imaturnih oocita¹⁸⁷.

Stopa fertilizacije od 73,26% kod pacijentkinja sa tubarnim faktorom infertiliteta je statistički značajno veća u odnosu na stopu fertilizacije od 66,14%, dobijenu kod pacijentkinja sa PCOS-om na nivou statističke značajnosti ($p < 0,001$). Ovi podaci se poklapaju sa podacima koje su objavili drugi autori u svojim istraživanjima^{8,188}. Smanjenu stopu fertilizacije nalaze Kodama i saradnici i Dor i saradnici^{166,170}. Neki autori opisuju sličnu stopu fertilizacije kod PCOS-a i pacijentkinja sa normalnim ovarijumima, što objašnjavaju dugačkom pituitarnom supresijom i modifikovanim dugačkim protokolom primenom oralnih kontraceptiva 25 dana pre desenzitizacije GnRH agonistima^{9,176}.

Ocenjivanjem kvaliteta embriona dobijenih IVF metodom ispitivane grupe pacijentkinja sa PCOS-om, i kontrolne grupe normoovulatornih žena sa tubarnim uzrokom infertiliteta, došli smo do rezultata da je u obe grupe bilo najviše embriona klase I (33,26% i 30,24%), a zapaža se tendencija manjeg broja embriona nižih klasa kvaliteta, te je najmanji procenat svih dobijenih embriona sa klasom IV. Poređenjem ispitivane i kontrolne grupe, nije

ustanovljena statistički značajna razlika u kvalitetu embriona. Srednji broj dobijenih embriona u grupi pacijentkinja sa PCOS-om iznosio je $(7,99 \pm 4,77)$, i bio je statistički značajno veći nego u kontrolnoj grupi $(5,33 \pm 3,21)$, dok se srednji broj transferiranih embriona nije se bitno razlikovao među grupama. Što se tiče poređenja u kvalitetu transferiranih embriona, nije ustanovljena statistički značajna razlika između ispitivane i kontrolne grupe, iako treba zapaziti da je za gotovo 8% veće učešće transferisanih embriona klase I, a duplo manji procenat klase IV u grupi žena sa PCOS-om u odnosu na kontrolnu grupu. Ovo objašnjavamo time što smo kod žena sa PCOS-om dobili značajno veći broj oocita, a samim tim i veći broj embriona klase I koji su u većem broju bili dostupni pri embriotransferu.

Uprkos činjenici da je dobijen veći broj oocita po ciklusu uz nižu stopu fertilizacije, PCOS pacijentkinje će postići slične stope kliničkih trudnoća po embriotransferu. Naš rezultat ostvarenih kliničkih trudnoća u PCOS grupi bio je 48,72%, dok je u kontrolnoj grupi rezultat bio 35,48%. Stopa implantacije bila je 22,64% kod pacijentkinja sa PCOS-om, a 17,92% u kontrolnoj grupi. Iako bez statistički značajne razlike nešto veći procenat kliničkih trudnoća i nešto veću stopu implantacije u PCOS grupi pacijentkinja, objašnjavamo produkcijom većeg broja oocita i dobijenih embriona klase I, što nam daje mogućnost selektiranja embrina za transfer i većom šansom za koncepciju. Prethodne studije Dora, Dalea i Homburga i njihovih saradnika, pokazale su da su stope trudnoće za žene sa PCOS-om podvrgnute IVF tretmanu, uporedive sa onim ženama koje imaju tubarni uzrok neplodnosti^{170,189,190}. Ispitujući 16 žena sa PCOS-om, i 37 normoovulatornih žena sa tubarnim faktorom infertiliteta u programu IVF-a, Dor i saradnici su došli do zaključka da nema razlike u uspehu ostvarenih trudnoća po aspiraciji (30,7% prema 29,7%). Dale i saradnici objavljuju rezultate od 33,3% uspešnosti kliničkih trudnoća po embriotransferu kod 44 žene sa PCOS-om uključenih u IVF. Homberg i saradnici izveštavaju o sličnim rezultatima. Swanton i saradnici 2010. godine, ispitujući ishod IVF-a kod PCOS, PCO i normalnih ovarijuma, objavljuju stope kliničkih trudnoća: kod PCOS-a 37%, PCO-a 43% i kod normalnih ovarijuma 44%. Takođe, u istoj studiji nije bilo značajne razlike ni u stopi živo rođene dece (PCOS:37%; PCO:38% prema 40% kod žena sa normalnim ovarijumima)⁸. Heijnenova meta-analiza pokazala je da nema signifikantne razlike u stopi trudnoće po započetom ciklusu (37,4% prema 32,3%), OR=1,0 (95% CI=0,8-1,3), i stopi kliničkih trudnoća po embriotransferu, OR=1,1 (95% CI=0,8-1,3), i pokazali da žene sa PCOS-om imaju sličnu priliku za trudnoćom i rađanjem po započetom IVF ciklusu kao i ne-PCOS žene¹⁶⁵.

Učestalost multifetalnih trudnoća između grupa (PCOS: 21,67% i kontrolne grupe 22,22%), nisu se statistički razlikovale. Iako je u ispitivanoj grupi bilo 6 ciklusa otkazivanja zbog različitih razloga, a u kontrolnoj samo jedan, nije bilo statističke značajnosti. Naš nalaz je u skladu sa rezultatima drugih autora koji nisu našli povećenu incidencu višestrukih trudnoća pacijentkinja sa PCOS-om u odnosu na kontrolnu⁸.

Pacijentkinje sa PCOS-om imaju do 44% spontanih pobačaja u prvom trimestru trudnoće. Kao mogući uzroci pobačaja opisuju se visoki nivoi plazminogen aktivator inhibitora, povišen nivo testosterona, androstenediona ili dehidroepiandrosterona i smanjeni nivoi progesterona. Protein plazminogen aktivator inhibitora (PAI-Fx) redukuje krvotok u placenti, izaziva lizu placentarnih krvnih sudova i dovodi do placentarne insuficijencije¹⁹¹. Grupa autora stoji iza hipoteze da povišena LH sekrecija u folikularnoj fazi povećava incidencu pobačaja^{104,192}. U našem istraživanju stope pobačaja po IVF/ET ciklusu (6,84% prema 5,38%), kao i stope pobačaja po nastalim kliničkim trudnoćama (14,04% prema 15,15%), nisu se statistički razlikovale među grupama. Višu stopu pobačaja kod PCOS-a u IVF postupku našli su Ludwig i saradnici (1999.) i Wang i saradnici (2001.), dok Balen i saradnici (1993.) nalaze da je incidenca spontanog pobačaja kod PCOS 35,8%, ali da se, kada se koristi dugi protokol sa agonistima GnRH, učestalost pobačaja smanjuje na 20,3%. Homburg je 1993. godine takođe utvrdio da se upotrebom GnRH agonista, značajno smanjuje učestalost spontanih pobačaja kod žena sa PCOS-om. Naši rezultati su delom saglasni sa rezultatima autora koji nisu našli značajno veću stopu pobačaja kod PCOS pacijentkinja u programu vantelesnog oplođenja¹⁸⁸.

Većina autora, mada su rezultati kontradiktorni, govori o povećanoj incidenci OHSS-a u superovulaciji pacijentkinja sa PCOS-om. Kao objašnjenje navode povećane serumske koncentracije VEGF-a u hipertrofičnoj stromi policističnih jajnika, i mnogo veći protok krvi kod policističnih nego kod žena sa normalnim jajnicima¹⁹³. Swanton i saradnici su objavili da je od 5727 stimuliranih IVF ciklusa započelih u Oxford Fertility Unit-u od novembra 1999. godine, do novembra 2006. godine, bilo 117 (2%) zabeleženih slučajeva teškog OHSS-a na Oxfordu. Ove stope su u skladu sa stopama teškog oblika OHSS-a koje su dobili Mac Dougall i saradnici (1992.) i Navot i saradnici (1992.). Naveli su i da je ova cifra potcenjena jer su pacijenti mogli biti primljeni u druge bolnice a da pri tom nisu obavestili IVF jedinicu. Takođe, njihovi nalazi su pokazali da žene sa ovulatornim PCO razvijaju slične stope teškog OHSS-a, u odnosu na žene sa PCOS-om, a one su značajno veće od žena sa normalnim jajnicima. Ovo je delimično objašnjeno činjenicom da je broj folikula, dobijenih oocita i pik nivoa estradiola značajno povišen kod žena sa PCO i PCOS-om⁸. Okohue i saradnici su kod

svih pacijentkinja kod kojih je postojala sumnja za povećan rizik od razvoja OHSS-a na osnovu broja folikula, pogotovo ako ih je bilo više od 20, primenjivali „coasting“ privremeni prekid u trajanju od 1-2 dana. Izvestili su da je to smanjilo nivo estradiola, a kasnije i rizik od OHSS-a. Uprkos ovoj meri, i dalje beleže veću stopu OHSS-a u PCOS grupi, mada nijedna pacijentkinja nije razvila teški OHSS.

Kod naših ispitanica OHSS je zapažen samo kod pacijentkinja sa PCOS-om, i to gradus I kod 15 (12,20%) pacijentkinja, dok je gradus II bio zapažen samo kod 2 (1,63%) pacijentkinje. Teški oblik OHSS-a nismo imali tokom istraživanja. Samo u slučaju jedne pacijentkinje sa OHSS gradus II, primenili smo jednu od metoda sekundarne prevencije razvoja teškog oblika kasnog OHSS-a, zamrznuti su embrioni i urađen je odloženi embriotransfer. Prema tome, zastupljenost OHSS-a statistički je značajno veća kod pacijentkinja sa PCOS-om, u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,001$). Žene koje su mlađe imaju povećan rizik od razvoja OHSS-a. A činjenica da su žene u našoj kontrolnoj grupi statistički bile starije od žena u PCOS grupi, i da su imale statistički značajno manji broj dobijenih oocita, mogući su razlozi zbog kojih nije bilo slučajeva OHSS-a u ovoj grupi.

Brojne studije su analizirale kako predvideti i smanjiti incidencu OHSS-a. Ostaje i dalje predmet diskusije koliko su stvarno korisni faktori kao što su broj folikula, broj dobijenih oocita i serumski nivo estradiola. Jedan od načina da značajno smanjimo stopu OHSS-a je da imamo strože kriterijume za otkazivanje IVF ciklusa, što za uzvrat može uticati na stopu trudnoće po ciklusu, kao i na ukupno zadovoljstvo tretmanom. Otkazivanje ciklusa i zadržavanje primene hCG-a, smanjuje mogućnost razvoja OHSS-a. Međutim, rizik nije potpuno eliminisan jer može doći do endogenog LH talasa, posebno u ciklusima u kojima nisu korišćeni GnRH agonisti. Korišćenje antagonista GnRH u stimulacionim protokolima smanjuje učestalost OHSS-a^{137,194}. Krioprezervacija svih embriona ne smanjuje mogućí razvoj ranog OHSS-a, ali značajno smanjuje mogućí kasniji početak OHSS-a. Potrebna su dodatna istraživanja o patofiziologiji OHSS-a, što za uzvrat može dovesti do boljeg razumevanja i pronalaženja načina kako sprečiti njegov razvoj.

Kodama je takođe izvestio o značajno većoj incidenci odustajanja od embriotransfera u grupi žena sa PCOS-om zbog neuspešne fertilizacije i rizika od OHSS-a¹⁶⁶. Broj otkazivanja u našem istraživanju bio je veći u ispitivanoj grupi (6 pacijentkinja tj. 4,88%) nego u kontrolnoj (1 pacijentkinja tj. 1,06%), ali bez statistički značajne razlike.

Hipofizna desenzitizacija sa GnRH agonistima postala je gotovo univerzalna u klinikama koje se bave metodama ART-a. Agonisti blokiraju estrogenu pozitivnu povratnu spregu i preveniraju prevremeni porast endogenog LH-a. Tako dobijeni reverzibilni

hipogonadotropni hipogonadizam dozvoljava bolju kontrolu razvoja folikula i poboljšava stopu trudnoće u IVF programima^{195,196}. Supresija endogenog LH agonistima GnRH može imati posebnu prednost kod žena sa PCOS-om, tako da oocite koje sadrže folikuli mogu da se razvijaju u osetljivim policističnim jajnicima bez negativnog okruženja visokih toničnih LH koncentracija^{197,198}. Ove oocite biće bolje za oplodnju od onih iz ciklusa bez hipofizne desenzitizacije, što sugeriše da je kod žena sa PCOS-om zapravo problem u abnormalnom hormonskom miljeu^{197,199}.

Dva specifična cilja tretmana žena sa PCOS-om su popravka abnormalnog hormonskog miljea, supresijom povišenih vrednosti LH-a i povišenih vrednosti androgena, kao i izbegavanje OHSS-a. Produženom hipofiznom desenzitizacijom se izbegava početni porast gonadotropina sa oslobađanjem ovarijalnih steroida koji se javlja u kratkom protokolu. I dok dugi protokol teorijski obezbeđuje kontrolisanu stimulaciju, policistični ovarijumi još uvek pokazuju veću sklonost ka OHSS-u od normalnih²⁰⁰. Oba protokola, dugi i kratki, daju značajno veći broj oocita u PCOS žena nego u žena sa normalnim jajnicima, sa istom dozom egzogenih gonadotropina. Takođe je bilo predloženo da produžena desenzitizacija, 30 umesto 15 dana, redukuje nivo androgena²⁰¹. Kasnije studije nisu potvrdile da produžena desenzitizacija povećava stopu trudnoće, ali smanjuje incidencu OHSS-a. Generalno, kada se koriste GnRH agonisti, dokazano je da dugi protokol ima određene prednosti i postoje svi razlozi da se primeni kod žena sa PCOS-om, kao i kod onih sa normalnim jajnicima²⁰².

Druga debata u ovarijalnoj stimulaciji žena sa PCOS-om ticala se pitanja da li upotreba samo FSH-a ima ikakve prednosti nad HMG-om. Preparati prečišćenog urinarnog FSH-a sadrže neke LH aktivnosti, obično manje od 1%, i neke ranije studije pokazale su da indukcija ovulacije može se postići bez egzogenog LH-a²⁰³. Kod pacijentkinja sa hipogonadnim hipogonadizmom, maturacija folikula je često inkompletna zbog LH-a i njegovog dejstva na tekalne ćelije potrebnog za punu ovarijalnu steroidogenezu^{204,205}. Tako, prisustvo neke količine LH-a u hipogonadotropizmu jeste uslov za normalan folikularni razvoj. Mnoge studije nisu našle korist od upotrebe samo FSH-a u indukciji ovulacije kod anovulatornog infertiliteta^{90,206}. Od kad postoji IVF, saopštavani su rezultati meta-analiza i randomizovanih kontrolisanih komparativnih studija o upotrebi urinarnih derivata FSH-a i hMG-a. Tang i Balen su u poglavlju udžbenika o asistiranom reproduktivnim tehnikama, koje nosi naziv „Policistični jajnici i ART”, napisali da njihovom analizom studija drugih autora nisu mogli da primete razliku u ishodu između ovarijalne stimulacije sa urinarnim derivatima FSH-a ili hMG preparatima, kada se primenjuje dugi protokol GnRH agonistima²⁰⁷.

Poslednjih godina, rekombinantni FSH se sve više koristi u indukciji ovulacije i IVF-u. Iako postoji hipofizna supresija GnRH agonistima tokom IVF tretmana, nizak nivo endogenog LH dovoljan je da obezbedi adekvatnu steroidogenezu u zrelih folikulima. Rekombinantni FSH ima veću bioaktivnost od urinarnog FSH²⁰⁸. Teissier i saradnici 1999. godine su pokazali da žene sa PCOS-om koje su koristile hMG u IVF ciklusima imale su više nivoa testosterona i estradiola u poređenju sa onim koje su koristile rFSH zbog višeg nivoa LH-a u serumu²⁰⁹. Van Wely i saradnici 2003. godine su uradili meta-analizu ispitujući efikasnost i ishod IVF ciklusa dugim protokolom GnRH agonistima, poredeći ovarijalnu stimulaciju između rFSH i hMG. Ova meta-analiza je zaključila da nema dokaza o razlici između hMG i rFSH uzimajući u obzir broj dobijenih oocita, stopu trudnoća u toku/broj živorođene dece (OR=1,27; 95% CI 0,98-1,64). Nije bilo statistički značajne razlike u stopi pobačaja, multifetalnih trudnoća i incidenci OHSS²¹⁰. Andersen i saradnici 2006. godine takođe objavljuju da nije bilo razlike u ishodu upoređujući stimulaciju visokoprečišćenim hMG i rFSH²¹¹. FigenTurkcapar i saradnici 2013. godine objavljuju prospektivnu, randomizovanu, kontrolisanu studiju kojom je bilo obuhvaćeno 80 žena sa PCOS-om, od kojih su 38 primale hMG a 42 rFSH tokom dugog GnRH protokola agonistima. U grupi hMG su primetili, manji broj folikula srednje veličine, manji broj dobijenih ćelija ($p=0,002$) i manji broj zrelih MII oocita ($p=0,003$). Međutim nije bilo značajnih razlika između grupa u broju oplodjenih oocita, stopi fertilizacije, broju embriona najboljeg kvaliteta i broju transferiranih embriona. Nije bilo razlike u stopi trudnoće između grupa. OHSS je bio razvijen u 11,9% pacijenata rFSH grupe, dok u hMG grupi ga nije bilo. Privremeni prekid stimulacije bio je niži u hMG grupi (19,2% vs 48,9%, $p=0,013$)²¹². Međutim, ovi rezultati moralo bi da budu potvrđeni većim brojem randomizovanim kontrolisanim studijama i meta-analizama.

Uvođenje GnRH antagonista u protokole stimulacije gonadotropinima dalo je veliku nadu pacijentima sa PCO i PCOS. GnRH antagonisti blokiraju receptore za GnRH kompetitivnom inhibicijom i zato je njihov efekat brz, već nakon nekoliko sati. Zbog izostanka supresivnog učinka koji imaju agonisti, bolji je odgovor jajnika na stimulaciju gonadotropinima. Novi IVF protokol sa GnRH antagonistima može da ponudi kraći i jednostavniji tretman u komparaciji sa dugim GnRH agonist protokolom^{213,214}. Sistematski pregled Cohranove baze podataka je, uključujući 27 RCTs, poredeći GnRH protokol antagonistima sa dugim protokolom GnRH agonistima, pokazao značajno manju incidencu teškog OHSS-a u protokolu sa antagonistima, sa relativnim rizikom 0,61 (95% CI 0,42-0,89)¹⁵⁰. Još jedna prednost korišćenja GnRH antagonista je mogućnost davanja GnRH agonista umesto hCG-a, za završno sazrevanje oocita^{215,216}. Izazivanje ovulacije GnRH

agonistima je potencijalno približnije fiziološkom, i može smanjiti rizik od OHSS-a u poređenju sa upotrebom hCG-a zbog kraćeg vremena poluraspada (1 sat u odnosu na 32-34 sata)^{216,217}.

Sing i saradnici su 2014. godine objavili retrospektivnu analizu poređenjem 81 pacijentkinje kod kojih je ovarijalna stimulacija izvršena dugim protokolom agonistima, i 36 pacijentkinje kod kojih je ovarijalna stimulacija izvršena protokolom antagonistima. Ukupna doza gonadotropina je bila značajno manja ($p=0,004$) u grupi antagonista. Nije bilo značajne razlike u stopi trudnoće ili incidenci OHSS-a između dve grupe. Stopa otkazanih ciklusa je bila značajno veća u grupi antagonista zbog izostanka rasta folikula ($p=0,027$)²¹⁸.

Meta-analiza Lin i saradnika iz 2014. godine, obuhvata devet prospektivnih, randomizovanih studija između 2002. i 2013. godine sa 588 žena sa PCOS-om, tretiranih dugim protokolom agonistima u IVF/ICSI ciklusima i 554 žena sa PCOS-om tretiranih protokolom sa antagonistima. Rezultat ove meta-analize je da su stope kliničkih trudnoća po embriotransferu bile slične (relativni rizik: 0,97, 95% CI:0,85-1,10). Nije bilo signifikantne razlike u godinama, BMI-u, ukupnoj dozi gonadotropina, danima potrebnim za stimulaciju i broju dobijenih oocita. Protokol antagonistima je bio bolji od dugog protokola agonistima u pogledu manjeg broja teškog OHSS-a (OR:1,56, 95% CI:0,29–8,51). Stope kliničkih trudnoća su bile slične u oba protokola²¹⁹. Naši rezultati su većim delom saglasni sa ovom meta-analizom. Ni u našem istraživanju nije bilo signifikantne razlike u godinama, BMI-u, ukupnoj dozi gonadotropina, ali je trajanje stimulacije u dugom protokolu GnRH agonistima trajalo ($10,90\pm 1,94$) dana, što je statistički bilo duže nego u protokolu sa antagonistima GnRH gde je trajanje stimulacije iznosilo ($9,44\pm 2,40$) dana.

Sistematski pregled i meta-analiza Xiao i saradnika 2013. godine o efektima GnRH antagonista u tretmanu pacijentkinja sa PCOS-om koji su prošli IVF program, uključila je sedam objavljenih randomizovanih, kontrolisanih, studija sa 755 pacijenata. Zapaženo je da nije bilo značajne razlike u količini utrošenih gonadotropina, broju dobijenih oocita, stopi kliničkih trudnoća (OR=1,08; 95% CI:0,80-1,45) i stopi pobačaja (OR=0,91; 95% CI:0,54-1,53) između grupe antagonista i agonista. Stopa OHSS u grupi antagonista je bila niža nego u grupi agonista GnRH i razlika je bila statistički značajna (OR=0,36; 95% CI:0,25-0,52)²²⁰. Meta-analiza Griesingera i saradnika 2006. godine nije našla statistički značajnu razliku u broju dobijenih jajnih ćelija između grupa žena sa PCOS-om tretiranih GnRH agonistima i GnRH antagonistima²²¹. Kurzawa i saradnici u studiji rađenoj 2008. godine izvestili su da nisu našli razliku u broju zrelih jajnih ćelija nakon aspiracije kod pacijentkinja sa PCOS-om u grupi sa GnRH agonistima i grupi GnRH antagonista²²².

Mi smo u dugom protokolu sa agonistima GnRH imali statistički veći broj folikula ≥ 16 mm i veći broj aspiriranih oocita sa statističkom značajnošću od ($p < 0,001$), dok je broj zrelih i nezrelih oocita kao i srednji broj oplodjenih jajnih ćelija bio veći uz statističku značajnost od $p < 0,01$. Kurzawa je pokazao da nema razlike između dve grupe u vezi sa stopom fertilizacije, koja je u našem istraživanju bila slična u obe grupe (65,39% prema 68,13%). Endometrijum je na dan davanja hCG-a bio statistički deblji u grupi agonista ($10,62 \pm 1,59$) mm u odnosu na grupu pacijentkinja gde su primenjivani antagonisti GnRH ($9,70 \pm 1,09$) mm. Sličnu razliku u debljini endometrijuma su našli Huang SY i saradnici u studiji koja je obuhvatala neselektovane pacijentkinje koje su bile podvrgnute IVF/ET-u. Veruje se da endometrijum debljine manji od 8 mm može imati uticaj na nisku stopu trudnoće. Kao i gore pomenuti autiri, ni mi nismo mogli da dokažemo da je razlika u debljini endometrijuma uticala na stopu trudnoće²²³.

Ukupan broj dobijenih embriona u našem istraživanju bio je veći u grupi agonista GnRH. Ovi pacijenti imali su više embriona klase I, dok su u grupi antagonista pacijentkinje imale veći broj embriona klase II i klase III. Ova razlika u većem broju dobijenih embriona, kao i većem broju embriona klase I u grupi agonista, nije uticala na stopu kliničkih trudnoća jer su razlike u kvalitetu embriona među grupama anulirane pri embriotransferu. Verujemo da je ova razlika važna u smislu krioprezervacije embriona. Obzirom da se transferira najviše dva i ne više od tri embriona, nije bilo razlike u broju transferiranih embriona. Znamo da su embrioni klase IV lošeg kvaliteta i kao takvi nisu pogodni za embriotransfer, a posebno ne za singl embriotransfer. U našoj studiji korišćeno je ukupno 12 embriona klase IV za embriotransfer u grupi agonista, isključivo kao treći embrioni zajedno sa druga dva klase I i II, i kao takvi po našem mišljenju nisu mogli da utiču na stopu trudnoće.

Raspoloživi podaci u literaturi o ishodu IVF-a poredeći ova dva protokola još uvek su zbunjujući. Inicijalni pregled Cochrane-ove baze podataka kojom je bilo uključeno pet kontrolisanih randomiziranih studija, ispitujući opštu IVF populaciju, prijavio je značajno (5%) manju stopu kliničkih trudnoća kod žena stimulisanih protokolom sa antagonistima, u poređenju sa dugim protokolom sa agonistima GnRH²²⁴. Meta-analiza Kolibianakisa i saradnika 2006. godine pokazala je da se verovatnoća rađanja žive dece ne razlikuje u protokolima GnRH agonista i GnRH antagonista¹²⁵. Nasuprot tome, Al-Inany i saradnici 2006. godine uključili su 27 randomizovanih kontrolisanih studija sa 3865 pacijentkinja i pokazali da stope kliničkih trudnoća (OR 0,84; 95% CI 0,72–0,97; $P=0,0088$) i stope trudnoća u toku/stope živorođene dece (OR 0,82; 95% CI 0,69–0,98; $P=0,03$) signifikantno niže u grupi antagonista²²⁵. Međutim, najnoviji pregled Cochrane-ove baze podataka nije

prijavio nikakvu značajnu razliku u stopi živorođene dece (OR 0,86; 95% CI 0,69–1,08) i stopi trudnoća u toku (OR 0,87; 95% CI 0,77–1,00) između dva protokola, čime se potvrđuje da su oba protokola uporediva u tom pogledu²²⁶. Poslednje dve meta-analize koje su poredile dva pomenuta protokola kod žena sa PCOS-om, jesu Pundir i saradnici 2012. godine koja je pokazala da ne postoji značajna razlika u stopi kliničkih trudnoća (RR 1,01; 95% CI 0,88–1,15) i Xiao i saradnici 2013. godine koja je pokazala da ne postoji značajna razlika u stopi trudnoća u toku (OR: 0,87; 95% CI: 0,74–1,03) i stopi živorođene dece (OR: 0,89; 95% CI: 0,64–1,24) između dva protokola^{220,227}.

Generalno, u našoj studiji klinička efikasnost oba protokola bila je slična. Stopa implantacije kao i stopa kliničkih trudnoća su pokazale da nema razlike između primenjenih protokola. Broj multifetalnih trudnoća kao i pojava OHSS-a, bili su viši u grupi agonista.

Meta-analiza Pundir i saradnika iz 2012. godine poredi dva najčešće korišćena protokola stimulacije jajnika kod žena sa PCOS-om, i to protokol antagonistima GnRH i dugi protokol agonistima GnRH, gledajući učestalost OHSS-a²²⁷. Prema ovoj meta-analizi nije bilo značajne razlike u učestalosti teškog OHSS-a, u poređenju grupe antagonista sa grupom dugog protokola agonista. Takođe, ostala je i nesignifikantna učestalost umerenog OHSS-a između dve grupe. Međutim, kada su svi slučajevi umerenog i teškog OHSS-a bili objedinjeni, upotreba protokola sa antagonistima povezana je sa znatno manjim rizikom od OHSS-a (relativni rizik: 0,60; 95% CI 0,48–0,76; $p < 0,0001$). U poređenju sa dugim protokolom sa agonistima, upotreba antagonista je povezana sa približno 40% manjom učestalošću umerenog i teškog OHSS-a. Ove rezultate treba uzeti sa rezervom, jer su studije obuhvaćene ovom meta-analizom pokazale znatnu metodološku i kliničku heterogenost u pogledu definisanja ozbiljnosti OHSS-a. Značajne varijacije postojale su i u samoj stimulaciji tj. podešavanju doze gonadotropina zavisno od odgovora jajnika na već primenjenu dozu.

Umereni OHSS, gradus II, imale su dve pacijentkinje u grupi agonista tokom našeg istraživanja, i nije bilo pacijentkinja sa ovom teškom komplikacijom u grupi sa antagonistima. Nedostatak statistički značajne razlike može biti povezan sa malim uzorkom, ali mišljenja smo da pet puta više multifetalnih trudnoća 11 (14,67%) u grupi agonista u odnosu na 2 (4,76%) u grupi antagonista, i više od četiri puta više pacijentkinja sa OHSS-om 14 (17,95%) u grupi sa agonistima GnRH u odnosu prema 3 (6,67) ne može isključiti klinički značajnu razliku.

Za pacijente sa sindromom policističnih jajnika, insulinska rezistencija je prepoznata kao jedan od ključnih faktora koji doprinose patofiziologiji bolesti. Obzirom na ulogu insulinske rezistencije u PCOS-u, insulin-senzibilisajući lekovi uzeli su dosta pažnje za lečenje neplodnosti u ovoj populaciji. Metformin, oralni bigvanid protiv hiperglikemije, često je

ispitivan u poslednjih 15 godina. On snižava nivo glukoze u krvi povećanjem periferne glukoze, smanjuje crevnu apsorpciju glukoze i suzbija nivo glukoze u jetri. Kod anovulatornih žena sa PCOS-om, snižava nivo insulina, produkciju LH-a i nivo androgena²²⁸. Kada se koristi za indukciju ovulacije kod PCOS pacijenata, utvrđeno je da metformin dovodi do povećanja frekvencije ovulacije i povećanja stope kliničkih trudnoća, mada sam lek nije superioran u odnosu na indukciju ovulacije klomifen citratom^{229–231}. Zbog potencijalne koristi metformina koju on ima na plodnost, postala je uobičajena praksa da ginekolog administrira ili nastavi sa već propisanom terapijom metforminom od strane endokrinologa kod pacijentkinja koje prolaze kroz postupak IVF-a. Do sada su studije pokazale kontraverzne rezultate o upotrebi metformina u PCOS pacijentkinja koje prolaze IVF tretman u odnosu na reproduktivni ishod. Najčešće indikacije za primenu metformina u IVF ciklusima su: visok nivo insulina u serumu, PCOS udružen sa gojaznošću i anovulacijom, intoleranciju na glukozu, insulinsku rezistenciju ili PCOS koji je pokazivao kliničke ili biohemijske znake hiperandrogenizma, pacijentkinje sa PCOS-om koje su imale pobačaje, PCOS pacijentkinje koje su u prethodnom ciklusu imale loš kvalitet dobijenih oocita.

Tang i saradnici su 2006. godine sprovedi jedno od prvih većih istraživanja ispitujući efekat metformina na IVF tretman u PCOS pacijenata. To je randomizirana, placebo kontrolisana, dvostruko slepa studija koja je uključivala 101 IVF ciklus. Nisu našli razliku u dozi gonadotropina, broju dobijenih oocita, stopi fertilizacije i kvalitetu embriona. Međutim, postoji statistički značajno veća stopa kliničkih trudnoća po ciklusu (38,5% u odnosu na 16,3%, $p=0,02$) i stopa kliničkih trudnoća po embriotransferu (44,4% u odnosu na 19,1%, $p=0,02$) u grupi sa metforminom. Takođe je bilo statistički značajno manje ovarijalnog hiperstimulacionog sindroma (3,8%) u grupi sa metforminom u odnosu na (20,4%) u placebo grupi ($p=0,02$). Njihov zaključak je bio da kratki co-tretman metforminom kod PCOS pacijenata koje prolaze kroz IVF/ICSI cikluse ne poboljšava odgovor na stimulaciju, ali signifikantno povećava stopu trudnoće i smanjuje rizik od OHSS-a²³². Prospektivna, randomizovana, multicentrična, dvostruko slepa kontrolisana studija koju su radili Kjtrod i saradnici 2011. godine, ispitivala je efekat metformina u 150 ne-gojaznih žena sa PCOS-om ($BMI < 28 \text{ kg/m}^2$) koje prolaze kroz IVF terapiju. Subjekti su tretirani metforminom najmanje 12 nedelja pre početka ciklusa VTO-a. Među IVF tretiranim ženama nije bilo razlike u kliničkim trudnoćama između metformin i placebo grupe. Međutim, zbog spontanih začeća koja su se dogodila pre IVF-a, bilo je značajno više kliničkih trudnoća (50,0% u odnosu na 33,3%, $p=0,04$) i živo rođene dece (48,6% u odnosu na 32,0%, $p=0,04$) u grupi sa

metforminom²³³. Zanimljivo je da je u prethodnom duploslepom, randomizovanom, kontrolisanom istraživanju urađenom od strane istog autora Kjotrod i saradnika 2004. godine u kojoj su pacijenti sa PCOS-om stratifikovani po BMI-u, objavljeno da nema razlike u stopi trudnoće i stopi živo rođene dece između grupe koja je koristila metformin i placebo grupe, za sve pacijente obuhvaćene istraživanjem. Samo su u grupi pacijenata sa normalnom telesnom težinom stope kliničkih trudnoća bile značajno veće za metformin grupu (67% prema 33%, $p=0,06$)²³⁴. Palomba i saradnici 2013. godine obavljaju sistematski pregled i meta-analizu deset randomiziranih kontrolisanih studija ispitujući upotrebu metformina u IVF terapiji za PCOS pacijente. Meta-analizom je bilo obuhvaćeno 845 pacijenata. Oni su ustanovili da upotreba metformina nije imala efekte na stopu kliničkih trudnoća (OR:1,2 95% CI:0,90–1,61) i stopu živo rođene dece (OR:1,7 95% CI:0,85–3,34). Objavili su da je metformin povezan sa smanjenim rizikom za OHSS (OR:0,27 95% CI:0,16–0,46) i smanjenim rizikom od pobačaja (OR:0,50 95% CI:0,3–0,83)²³⁵.

Mi nismo našli razliku u ovarijalnom odgovoru kod pacijentkinja koje su tokom IVF-a koristile terapiju metforminom, u odnosu na pacijentkinje koje nisu koristile metformin. Količine utrošenih gonadotropina nisu se razlikovale među grupama. Broj aspiriranih oocita, broj zrelih oocita i stopa fertilizacije bile su uporedive. Razlikovala se dužina trajanja stimulacije jer je kod pacijentkinja koje su koristile metformin stimulacija trajala duže u odnosu na one koje nisu koristile metformin ($p<0,05$). Takođe, pacijentkinje koje su koristile metformin imale su statistički značajno deblji endometrijum. Mišljenja smo da je razlika u dužini stimulacije nastala jer su početne doze gonadotropina kod pacijentkinja koje su koristile metformin bile niže, i da smo bili oprezniji pri njihovom uvećanju tokom stimulacije imajući u vidu da su to bile pacijentkinje sa intolerancijom na glukozu i dokazanom IR-om, a samim tim i sa dodatno naglašenim odgovorom na stimulaciju. U pogledu kvaliteta dobijenih embriona, javila se razlika kod embrina kvaliteta IV klase koja je anulirana prilikom embriotransfera. Stope kliničkih trudnoća po embriotransferu i stope pobačaja takođe nisu se razlikovale. Nije bilo razlike ni u pogledu multifetalnih trudnoća. Dokazali smo statistički značajno veću zastupljenost OHSS-a gradusa I u grupi pacijentkinja bez metformina. Naši rezultati su većim delom saglasni sa rezultatima meta-analize koju su uradili Palomba i saradnici.

U moru različitih nalaza pojedinačnih studija i meta-analiza, efekat metformina na ishod IVF lečenja kod PCOS pacijentkinja je promenjiva koja u dobroj meri zavisi od kliničkog fenotipa pacijenta. Značajne varijabilnosti postoje u pogledu samih protokola o primeni metformina tokom IVF postupka. Početak primene metformina se vezuje za period

od bar 3 meseca pre IVF-a, ili obično za period pred sam početak stimulacije. Vreme prestanka terapije se takođe razlikovalo, neki autori su upotrebu metformina prekidali na dan pozitivnog testa na trudnoću ili sa navršениh 12 nedelja gestacione starosti trudnoće. Ovaj trend varijabilnosti ogledao se i u primenjenoj dozi leka koja se kretala od 1000-2500 mg/dan, najčešće između 1500 i 2000 mg/dan.

Teissier i saradnici su 2000. godine predložili da je folikularno endokrino mikro okruženje odgovorno za kvalitet oocite kod žena koje prolaze IVF, i višak koncentracije folikularnog androgena može uticati na kvalitet oocite²³⁶. Tang je pokazao da 4 nedelje tretmana sa metforminom smanjuje serumski nivo testosterona i nivo slobodnih androgena. Ali da bi se poboljšao kvalitet oocita tretman metforminom treba početi bar tri meseca pre IVF ciklusa, koliko traje sazrevanje od primordijalnih do antralnih folikula²³⁷. Na osnovu postavljenog postulata da upotreba metformina poboljšava ishod trudnoće, mnogi autori pokušali su to da dokažu, a ujedno objasne način koji dovodi do toga. Poznato je da nivo androgena u krvi raste tokom stimulacije jajnika u IVF ciklusima, i da ovi nivoi imaju tendenciju da budu veći u PCOS pacijenata. Takođe je poznato da visoki nivoi androgena negativno utiču na ishod trudnoće^{166,238}. Tang je svojom studijom uspeo da pokaže da su ukupni testosteron i nivoi FAI bili značajno niži u metformin grupi. On je još primetio negativnu korelaciju između FAI i serum hCG-a merenog 12. dana nakon embriotransfera²³². Takođe je pokazao da metformin smanjuje nivo estradiola na dan administracije hCG-a. Nađeno je da je serumski nivo estradiola veći kod žena sa PCOS-om koje prolaze IVF tretman u odnosu na kontrolnu grupu. Ovo zapažanje se može objasniti povećanim nivoima androgenih supstrata i aromataznom aktivnošću. Osim toga, insulin i insulinu sličan faktor rasta I uvećavaju stimulatorni efekat FSH-a na produkciju estrogena u granulosa ćelijama. Prema tome, efekti metformina na smanjenje androgena i insulina mogao bi da doprinese i snižavanju koncentracije estradiola.

Pored toga, utvrđeno je da metformin direktno smanjuje aromataznu aktivnost²³⁹. Svi ovi nalazi takođe mogu objasniti brzo biohemijsko poboljšanje u serumskim koncentracijama testosterona i estradiola već nakon kratke primene metformina.

Odavno je poznato da pacijenti sa PCOS-om koji prolaze kroz IVF tretman, imaju povećani rizik od razvoja OHSS-a. Kardinalna karakteristika patogeneze OHSS-a jesu povećana kapilarna propustljivost i povećane vrednosti VEGF-a. VEGF je endotelijalni ćelijski mitogen sa snažnim angiogenim svojstvima i smatra se ključnim medijatorom OHSS-a. Na dan aspiracije oocita pronađene su veće vrednosti VEGF-a u serumu kod pacijenata sa PCOS-om u odnosu na kontrolnu grupu, kao i kod žena koje razvijaju OHSS²⁴⁰. Pored toga Miele i saradnici su 2000. godine pokazali da insulin i IGF-I povećavaju VEGF

mRNA ekspresiju²⁴¹. Na osnovu navedenih dokaza, smanjena učestalost OHSS-a u metformin grupama može da bude pripisana njegovom dejstvu na smanjenje nivoa insulina, a time i na smanjenje proizvodnje VEGF²⁴².

Anti-Müllerian hormon, takođe poznat kao Müllerian inhibitorna substancija (MIS), je specifičan produkt ćelija granulose ranog razvoja preantralnih i malih antralnih folikula u jajnicima, a opada sa starošću. Zbog toga AMH je predložen kao nov klinički marker ovarijalne rezerve²⁴³. Još jedan od ključnih razloga povezan sa zainteresovanošću za AMH, je činjenica da su nivoi serumskog AMH-a značajno povećani kod žena sa sindromom policističnih jajnika kada se uporede sa normoovulatornim ženama²⁴⁴. Kao isključiv proizvod granulosa ćelija, prvobitno je predloženo da je rast serumskog AMH-a u PCOS-u posledica povećanog broja malih antralnih folikula u ovim jajnicima. Međutim, nedavne studije primetile su da je rast koncentracije AMH-a više vezan za povećanu produkciju ovog hormona u svakom folikulu. Zaista, pronađene su koncentracije AMH-a do pet puta veće u folikularnoj tečnosti iz nestimulisanog folikula PCOS žena, u odnosu na normoovulatorne kontrole²⁴⁵. Nivo AMH-a je izgleda povezan sa težinom PCOS-a, koja se reprezentuju povišenim koncentracijama LH-a, testosterona ili insulina, kao i povećanim brojem folikula i/ili zapreminom jajnika utvrđenom ultrazvukom^{246,247}. Serum koncentracija AMH-a je viša kod amenoreičnih nego kod oligomenoreičnih žena sa PCOS-om, što ukazuje da su viši nivoi AMH odraz većeg poremećaja folikulogeneze i funkcije ćelija granulose u jajniku²⁴⁶.

Nekoliko studija pokazalo je da koncentracija AMH-a trećeg dana menstrualnog ciklusa može da predvidi odgovor jajnika na stimulaciju gonadotropinima i šansu za trudnoćom tokom IVF-a²⁴⁸. Međutim, većina ovih studija nije fokusirana na žene sa PCOS-om. Nas je zanimalo da li koncentracija AMH-a merena trećeg dana nestimulisanog menstrualnog ciklusa može da predvidi odgovor jajnika na stimulaciju gonadotropinima i ishod IVF-a, kao i da li značajno povećana serum koncentracija AMH-a kod PCOS pacijenata je povezana sa slabijim reproduktivnim rezultatima.

Xi Wenyan i saradnici su 2012. godine istraživali da li koncentracija serum anti-Müllerian hormona trećeg dana može predvideti kontrolisanu ovarijalnu stimulaciju i reproduktivni ishod kod žena sa PCOS-om. Ukupno 164 PCOS pacijenta podelili su prema vrednostima AMH-a u tri grupe: grupa sa niskim vrednostima $AMH \leq 4,85$ ng/ml, grupa srednjih vrednosti AMH od 4,85-8,82 ng/ml i grupa sa visokim vrednostima $AMH > 8,82$ ng/ml. Pokazali su da se nivo estradiola na dan davanja hCG-a i broj dobijenih oocita značajno povećava sa povećanjem serum nivoa AMH, dok ukupna potrošnja gonadotropina se značajno smanjuje ($p < 0,05$). Stopa fertilizacije i broj embriona dobrog kvaliteta su

uporedivi među grupama niskog, srednjeg i visokog AMH ($p > 0,05$). Stopa implantacije u grupi visokog AMH-a, bila je značajno lošija u odnosu na grupu niskih i srednjih AMH koncentracija (27% vs 48,8% vs 50%, $p < 0,01$). Stopa kliničkih trudnoća bila je niža u grupi sa visokim vrednostima AMH-a u odnosu na druge dve grupe (45,9% vs 65% vs 66,7%, $p = 0,09$), ali ta razlika nije imala statističku značajnost²⁴⁹.

Karakteristike ovarijalnog odgovora u grupi pacijentkinja sa $AMH > 5$ ng/ml i grupi pacijentkinja sa $AMH \leq 5$ ng/ml bile su uporedive u našem istraživanju. Kvalitet jajne ćelije i uspeh fertilizacije kod pacijentkinja sa PCOS-om, u zavisnosti od vrednosti AMH-a, nije se razlikovao. Nije bilo razlike ni u pogledu transferiranih embriona, pa se i sama klinička efikasnost u zavisnosti od vrednosti AMH-a po grupama nije razlikovala. Primećena je veća učestalost OHSS-a kod pacijentkinja sa $AMH > 5$ ng/ml (17,07% vs 7,32%), ali bez statističke značajnosti. Utvrdili smo da AMH negativno korelira sa godinama starosti, kao i da ne utiče na stopu kliničkih trudnoća, pobačaja i multifetalnih trudnoća koje su bile slične u obe grupe.

Gojaznost je povezana sa nizom posledica po zdravlje, uključujući i štetan efekat na reproduktivno zdravlje. U poređenju sa ženama koje imaju normalan BMI (18,5-24,9 kg/m²), žene sa povećanim BMI-om imaju trostruko veći rizik od neplodnosti zbog poremećaja hipotalamus-hipofizne osovine, poremećaja menstrualnog ciklusa i anovulacije kao i psiholoških i socijalnih faktora koji utiču na reproduktivnu sposobnost. Nekoliko je razloga anovulacije i poremećaja menstrualnog ciklusa. U povećanoj količini masnog tkiva dolazi do povećane ekstraplandularne aromatizacije androgena u estrogene, što dovodi do hronično povećane koncentracije estrogena u krvi, a to kao posledicu ima izostanak porasta FSH-a između dva ciklusa i započinjanje folikulogeneze. Takođe, zbog visokih vrednosti insulina smanjeno je stvaranje SHBG-a, što uzrokuje povećanu količinu slobodnog estradiola i testosterona u cirkulaciji, koji potom inhibiraju FSH. Hiperinsulinemija koja nastaje kao posledica insulinske rezistencije utiče i na povećano stvaranje androgena u stromi jajnika, koji potom sprečavaju normalan razvoj folikula^{250,251}. Gojaznost je, takođe povezana sa povećanim rizikom komplikacija trudnoće²⁵². Ipak postoje različiti dokazi u vezi sa efektima povišenog BMI-a na ishod asistirane reproduktivne tehnologije.

Obzirom da je jedan od naših uključujućih faktora za sprovođenje postupka vantelesnog oplođenja $BMI < 30$ kg/m², mi smo sve ispitanice u okviru studijske grupe podelili na normalno uhranjene osobe sa BMI-om od $18 \leq 25$ kg/m² i umereno gojazne sa BMI-om od $25 \leq 30$ kg/m², tako da obezitetne tj. gojazne pacijentkinje sa $BMI > 30$ kg/m² nisu bile obuhvaćene ovim istraživanjem. Pokazali smo da se, bez obzira što smo dobili značajno veći broj zrelih oocita u grupi normalno uhranjenih pacijentkinja, sa značajno većom stopom

fertilizacije (68,22% u odnosu na 57,10%), kao i značajno većim brojem dobijenih i transferiranih embriona klase I (65,32% u odnosu na 34,29%), stope kliničkih trudnoća nisu razlikovale. Mišljenja smo da statistički značajnu razliku u stopi kliničkih trudnoća koja negativno korelira sa BMI-om nismo dokazali zbog malog uzorka, kao i zato što su sve pacijentkinje bile umereno gojazne sa srednjom vrednošću BMI-a od $(27,65 \pm 1,47)$. Primećen je i trend povećanja incidence OHSS-a sa smanjenjem BMI-a. Iako nema statističke značajnosti, zastupljenost OHSS gradus I procentualno je bitno veća kod ispitanica studijske grupe sa $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$, u odnosu na one sa $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ (14,58% vs 3,70%).

U retrospektivnoj studiji Metalliotakisa i saradnika iz 2008. godine kojom je bilo obuhvaćeno 140 žena sa $BMI \leq 24 \text{ kg/m}^2$ koje su prošle 219 IVF/ICSI ciklusa i 138 žena sa $BMI > 24 \text{ kg/m}^2$ koje su prošle ukupno 291 ciklus, pacijenti sa $BMI > 24 \text{ kg/m}^2$ pokazali su manji broj folikula i manji broj dobijenih oocita. Međutim, BMI nije uticao na stopu kliničkih trudnoća i stopu pobačaja, što se podudara sa našim rezultatima²⁵³. Bailey i saradnici su 2014. godine ispitujući efekat BMI-a na ishod in vitro fertilizacije kod žena sa PCOS-om, tokom svog istraživanja pacijente razvrstali u tri grupe: normalno uhranjene ($BMI 18,5-24,9$), umereno gojazne ($BMI 25-29,9$) i gojazne ($BMI > 30$). Njihovi rezultati pokazuju da postoje dve različite populacije, normalno uhranjene i gojazne, koje imaju različiti IVF ishod uključujući i rizik za OHSS. Gojazne PCOS žene imale su 69% manje šansi u kliničkim trudnoćama po započetom ciklusu ($OR: 0,31$; 95% $CI: 0,11-0,86$) i 77% manje šansi u kliničkim trudnoćama po embriotransferu ($OR: 0,23$; 95% $CI: 0,08-0,68$) u poređenju sa normalno uhranjenim PCOS ženama. Postojao je i trend smanjenja učestalosti OHSS-a sa povećanjem BMI-a između grupa: 19,6% kod normalno uhranjenih; 10,5% kod umereno gojaznih i 3,2% kod gojaznih²⁵⁴. Orvieto i saradnici su 2009. godine objavili studiju kojom su ispitali da li BMI može uticati na ishod IVF-a kod pacijenata sa PCOS-om koji prolaze stimulaciju jajnika GnRH agonistima i antagonistima. Proučavali su 100 IVF ciklusa, 35 pacijenata je tretirano dugim protokolom agonistima i 65 fleksibilnim multidoznim protokolom antagonistima. U oba protokola, pacijenti sa $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ su imali znatno veću stopu fertilizacije u poređenju sa pacijentima sa $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ ($p < 0,02$ i $p < 0,01$). Pacijenti sa $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ stimulisani dugim GnRH protokolom agonistima, pokazali su signifikantno veću stopu trudnoća (44,4% vs 11,8%; $p < 0,02$) u poređenju sa pacijentima sa $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ tretiranim istim protokolom, i signifikantno veću stopu trudnoće u odnosu na pacijente sa $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ i $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ tretirane protokolom sa antagonistima. Oni su zaključili da je dugi protokol GnRH agonistima dao veću stopu trudnoće kod normalno uhranjenih

pacijenata, verovatno zbog svoje sposobnosti da smanji visoki bazalni nivo LH i njegov štetni uticaj na kvalitet oocita i implantacioni potencijal²⁵⁵.

Huang i saradnici 2014. godine su imali značajno veću stopu kliničkih trudnoća kod normalno uhranjenih PCOS pacijenata u odnosu na grupu umereno gojaznih/gojaznih PCOS pacijenata (46,8% vs 26,5%, $p=0,022$)²⁵⁶.

Starenje jajnika započinje pre nego što žena primeti bilo kakve kliničke promene u svom menstrualnom ciklusu. Zbog toga one često nisu svesne da su izložene povećem riziku infertilnosti. Plodnost, definisana kao prirodna sposobnost žene za reprodukcijom, postepeno opada tokom života. Iako ovaj pad izgleda počinje sa 30 godina, on je više očigledan između 35-40, a dramatično povećan nakon navedenih godina. Uticaj godina žene jasno je utvrđen brojnim studijama koje su pokazale pad stope trudnoće sa povećanjem godina života²⁵⁷⁻²⁶⁰. Nakon 35. godine plodnost žene opada, a rizici od spontanih pobačaja, komplikacije trudnoće i neželjeni ishodi trudnoće se povećavaju²⁶¹. Dobro je poznato da je starost majke predispozicija za Daunov sindrom (trizomiju 21 para hromozoma). Rizik da će se roditi beba sa Daunovim sindromom raste sa starošću majke, udvostručuje se od 1:725 sa starošću od 32 godine na 1:365 sa starošću od 35 godina²⁶².

Mnogi autori su u svojim istraživanjima objavili da sa povećanjem starosti majke IVF rezultati postaju sve gori²⁶³. Sa godinama starosti žene će imati lošiji odgovor jajnika tokom kontrolisane ovarijalne hiperstimulacije, zahtevaće veće doze gonadotropina, imaće manji broj dobijenih oocita, nižu stopu fertilizacije, manji broj embriona dobrog kvaliteta, manju stopu implantacije, veću stopu pobačaja i veću stopu prevremeno rođene dece^{171,264-266}. Takođe, povećava se i stopa aneuploidija u jajnim ćelijama i embrionima sa povećanjem godina majke²⁶⁷.

U našem istraživanju pacijentkinje starije od 35 godina zahtevale su statistički značajno veću količinu gonadotropina tokom ovarijalne stimulacije ($1891,67 \pm 678,34$ vs $1590,24 \pm 489,3$ IU). U pogledu drugih karakteristika ovarijalnog odgovora vezanih za stimulaciju, nije bilo razlike. Nije se razlikovao broj dobijenih jajnih ćelija i njihova zrelost. Zapazili smo nešto nižu stopu fertilizacije (62,99%) kod pacijentkinja koje su imale više od 35 godina u odnosu na (66,79%) kod pacijentkinja mlađih od 35 godina. Iako nije bilo statistički značajne razlike, smatramo zbog malog broja pacijenata u grupi preko 35 godina (svega 17 pacijentkinja) dobijena je ne i značajno mala procentualna razlika u stopi ukupnih trudnoća po ET koja je iznosila 35,29% kod pacijentkinja preko 35 godina života, a 54,00% u grupi mlađih od 35 godina.

7. ZAKLJUČAK

Naučno-istraživački rad bi, po detaljno isplaniranoj metodologiji i postavljenim ciljevima, trebalo da rezultuje konkretnim i klinički primenljivim zaključcima. Na osnovu rezultata sprovedenog istraživanja mogu se doneti sledeći zaključci:

Analiziranjem starosne strukture, prosečna starost pacijentkinja u kontrolnoj grupi bila je statistički značajno veća. Zaključili smo da je razlika u godinama prisutna jer su pacijentkinje sa PCOS-om zbog prisustva oligo-anovulacija ranije tražile pomoć ginekologa u cilju ostvarivanja svoje reproduktivne funkcije. Normoovulatorne pacijentkinje sa regularnim menstrualnim ciklusima su se zbog ne dijagnostikovanog tubarnog infertiliteta znatno kasnije obratile ginekologu za pomoć. Ovaj vremenski period bitno se produžavao u slučajevima pacijentkinja koje nisu imale jedan jajovod ili je taj jajovod bio nefunkcionalan. Zbog postojanja drugog jajovoda, gajeći nadu spontanog začeća, one su se još kasnije javljale ginekologu za pomoć i pristupale VTO-u kao metodi lečenja.

Dužina trajanja stimulacije se nije razlikovala među grupama, ali su pacijentkinje sa PCOS-om zbog povećane osetljivosti na gonadotropine zahtevale statistički značajno manju ukupnu količina gonadotropina potrebnu za kontrolisanu ovarijalnu stimulaciju.

Pacijentkinje sa PCOS-om imaju značajno veći broj folikula i veći broj aspiriranih oocita nakon stimulacije gonadotropinima nego pacijentkinje u kontrolnoj grupi. Takođe, značajno je veći broj nezrelih jajnih ćelija u ukupnom broju aspiriranih oocita kod pacijentkinja sa PCOS-om. Uprkos činjenici da je dobijen veći broj oocita, veći broj embriona po ciklusu, uz nižu stopu fertilizacije, zaključili smo da pacijentkinje sa PCOS-om postižu slične stope kliničkih trudnoća po embriotransferu. Iako bez statistički značajne razlike, nešto veći procenat kliničkih trudnoća i nešto veću stopu implantacije u PCOS grupi pacijentkinja objašnjavamo produkcijom većeg broja oocita i dobijenih embriona klase I, što nam daje mogućnost selektiranja embrina za transfer i veću šansu za koncepciju. U pogledu komplikacija samog postupka, gde spadaju pobačaji, multifetalne trudnoće i otkazani ciklusi, nije bilo razlike među grupama.

Ovarijalni hiperstimulacioni sindrom je jatrogena komplikacija koja se javlja kod pacijentkinja sa PCOS-om, i gotovo nikad kod pacijentkinja sa tubarnim uzrokom inferiliteta.

Upotreba protokola sa GnRH antagonistima u žena sa PCOS-om povezana je sa kraćim trajanjem stimulacije. Dugi protokol agonistima GnRH daje veći broj folikula, veći broj aspiriranih oocita, veći broj zrelih kao i nezrelih oocita. Uprkos dobijenom većem

ukupnom broju embriona kao i embriona kvaliteta klase I u dugom protokolu sa GnRH agonistima, protokol sa antagonistima GnRH daje slične stope kliničkih trudnoća.

Iako ne postoji statistički značajna razlika u incidenci OHSS-a, primećena je ipak ređa pojava ove ozbiljne komplikacije ovarijalne stimulacije u protokolu sa antagonistima GnRH. Takođe, bitan klinički značaj je i znatno manji broj multifetalnih trudnoća u protokolu sa antagonistima GnRH.

Protokol sa GnRH antagonistima daje i potencijalnu prednost u poređenju sa još uvek prihvaćenim zlatnim standardom, dugim protokolom sa GnRH agonistima, uključujući mogućnost upotrebe GnRH agonista umesto hCG-a za završno sazrevanje oocita. Protokol antagonistima GnRH skraćuje vreme trajanja postupka i smanjuje troškove lečenja. Obzirom da je prijatniji za pacijenta u poređenju sa dugim protokolom GnRH agonistima, protokol GnRH antagonistima možda treba da predstavlja protokol izbora za pacijentkinje sa PCOS-om.

Ne postoje dokazi da upotreba oralnog antidijabetika – metformina pre i tokom IVF ciklusa kod pacijentkinja sa PCOS-om, povećava stopu kliničkih trudnoća po embriotransferu. Ne dovodi do razlike u broju dobijenih oocita, stopi fertilizacije i ne utiče na kvalitet embriona. Istraživanje je pokazalo da nema benefita od metformina u pogledu komplikacija trudnoće, ali statistički značajno redukuje rizik od razvoja OHSS-a gradusa I kod PCOS žena tokom IVF-a.

Utvrđili smo da je serum koncentracija AMH-a, merena trećeg dana nestimulisanog menstrualnog ciklusa, značajno povećana kod PCOS pacijentkinja. Postoji snažan pozitivan odnos između serum koncentracije AMH-a i odgovora jajnika na stimulaciju gonadotropinima u pacijentkinja sa PCOS-om. Koncentracija AMH-a utiče na određivanje početne doze gonadotropina za optimalan odgovor jajnika, ali još važnije za smanjenje kliničkih rizika povezanih sa preteranim odgovorom. AMH je dobar prediktor za predviđanje i određivanje doze gonadotropina, ali nije predictor kvaliteta jajnih ćelija i kvaliteta dobijenih embriona. Zbog toga ne utiče na stopu kliničkih trudnoća, kao i na komplikacije trudnoće. Postoji negativna korelacija koncentracije AMH-a sa godinama starosti.

Umerena gojaznost $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ povezana je sa manjim brojem zrelih jajnih ćelija i manjim brojem kvalitetnih embriona, ali pošto je broj dobijenih jajnih ćelija i dobijenih embriona u PCOS pacijentkinja generalno veći, to nije uticalo na stopu kliničkih trudnoća. Relativno je mali broj pacijentkinja sa PCOS-om kod kojih je bila prisutna samo umerena gojaznost, a prateći inkluzione kriterijume našeg istraživanja, nismo pokazali značajnu razliku u stopi kliničkih trudnoća koja negativno korelira sa BMI-om. Takođe, primećen je

trend povećanja incidence OHSS-a sa smanjenjem BMI-a. Iako nema statističke značajnosti, zastupljenost OHSS gradus I procentualno je bitno veća kod ispitanica studijske grupe sa $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$, u odnosu na one sa $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$.

Sa povećanjem godina starosti, rezultati uspeha VTO-a su lošiji. Pacijentkinje starije od 35 godina imaju slabiji ovarijalni odgovor na kontrolisanu ovarijalnu stimulaciju.

8. LITERATURA

1. Hart R, Hickey M, Franks S. Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(5):671-83.
2. Zlopaša G. Adipokines in patients with polycystic ovary syndrome [dissertation]. Zagreb: Medical School; 2011(Croatia).
3. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 1935;29:181-91.
4. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet.* 2007;370(9588):685-97.
5. Radulović A, Bogovac M, PjevićTrninić A. Menstrual cycle disorders in polycystic ovary syndrome--ultrasonographic characteristics and hormonal status. *Med Pregl.* 2002;55(5-6):241-6.
6. Chang RJ, Katz SE. Diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1999;28(2): 397-408.
7. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod.* 2010;25(2):544-51.
8. Swanton A, Storey L, McVeigh E, Child T. IVF outcome in women with PCOS, PCO and normal ovarian morphology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;149(1): 68-71.
9. Ludwig M, Finas DF, al-Hasani S, Diedrich K, Ortmann O. Oocyte quality and treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection cycles of polycystic ovarian syndrome patients. *Hum Reprod.* 1999;14(2):354-8.
10. Fedorcsak P, Dale PO, Storeng R, Tanbo T, Abyholm T. The impact of obesity and insulin resistance on the outcome of IVF or ICSI in women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 2001;16(6):1086-91.
11. Zawadski JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FR, Merriam GR, editors. *Polycystic Ovary Syndrome.* Boston: Blackwell Scientific Publications; 1992. p. 377-84.

12. Azziz R. Definition, Diagnosis, and Epidemiology of the Polycystic Ovary Syndrome. In: Azziz R, editor. *The Polycystic Ovary Syndrome Current Concepts and Clinical Care*. New York: Springer; 2007. p. 1-15.
13. Rotterdam ESHRE/ASRM – Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*. 2004;19(1):41-7.
14. Lee TT, Rausch ME. Polycystic ovarian syndrome: role of imaging in diagnosis. *Radiographics*. 2012;32(6):1643-57.
15. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(11):4237-45.
16. Trivax B, Azziz R. Diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol*. 2007;50(1):168-77.
17. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(6):2745-9.
18. Mehrabian F, Khani B, Kelishadi R, Ghanbari E. The prevalence of polycystic ovary syndrome in Iranian women based on different diagnostic criteria. *Endokrynol Pol*. 2011;62(3): 238-42.
19. Carmina E, Azziz R. Diagnosis, phenotype, and prevalence of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2006;86 Suppl 1:S7-8.
20. Belosi C, Selvaggi L, Apa R, Guido M, Romualdi D, Fulghesu AM, et al. Is the PCOS diagnosis solved by ESHRE/ASRM 2003 consensus or could it include ultrasound examination of the ovarian stroma? *Hum Reprod*. 2006;21(12):3108-15.
21. Rosenfield RL. Clinical practice. Hirsutism. *N Engl J Med*. 2005; 353(24): 2578-88.
22. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1961;21:1440-7.
23. Huang A, Brennan K, Azziz R. Prevalence of hyperandrogenemia diagnosed by the National Institutes of Health 1990 criteria. *Fertil Steril*. 2010;93(6):1938-41.
24. Barth JH, Field HP, Yasmin E, Balen AH. Defining hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome: measurement of testosterone and androstenedione by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and analysis by receiver operator characteristic plots. *Eur J Endocrinol*. 2010;162(3):611-5.

25. Balen AH, Laven JS, Tan SL, Dewailly D. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update*. 2003;9(6):505-14.
26. Hiremath P, Tegnoor J. Follicle detection and ovarian classification in digital ultrasound images of ovaries, *Advancements and Breakthroughs in Ultrasound Imaging*, InTechOpen, UK (2013) 167–199
27. Govind A, Obhrai MS, Clayton RN. Polycystic ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(1):38-43.
28. Leibel NI, Baumann EE, Kocherginsky M, Rosenfield RL. Relationship of adolescent polycystic ovary syndrome to parental metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1275-83.
29. Goodarzi M. Genetics of PCOS. In: Azziz R, editor. *The Polycystic Ovary Syndrome Current Concepts on Pathogenesis and Clinical Care*. New York: Springer; 2007. p. 29-42.
30. Apter D. Pubertal development in PCOS. In: Azziz R, editor. *The Polycystic Ovary Syndrome Current Concepts and Clinical Care*. New York: Springer; 2007. p. 327-38.
31. Rosenfield RL. Clinical review: Identifying children at risk for polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):787-96.
32. Ibanez L, Dimartino-Nardi J, Potau N, Saenger P. Premature adrenarche – normal variant or forerunner of adult disease? *Endocr Rev*. 2000;21(6):671-96.
33. Lenarcik A, Bidsinska-Speichert B, Tworowska-Bardzinska U, and Krepula K. Hormonal abnormalities in first-degree relatives of women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Endokrynol Pol*. 2011; 62(2): 129-33.
34. Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update*. 2005;11(4):357-374.
35. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of Polycystic ovary syndrome- a hypothesis. *J Endocrinol*. 2002;174(1):1-5.
36. Hart R, Sloboda DM, Doherty DA, Norman RJ, Atkinson HC, Newnham JP, et al. Circulating maternal testosterone concentrations at 18 weeks of gestation predict circulating levels of antimullerian hormone in adolescence: a prospective cohort study. *Fertil Steril*. 2010;94(4):1544-7.
37. Chang RJ. The reproductive phenotype in polycystic ovary syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3(10):688-95.

38. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Anovulation and the Polycystic Ovary. In: Speroff L, Glass RH, Kase NG, editor. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 6. edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 1999. p. 487-521.
39. Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW, Franks S. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(4):1158-65.
40. Nelson VL, Legro RS, Strauss JF 3rd, McAllister JM. Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol*. 1999;13(6):946-57.
41. Diamanti-Kandarakis E. Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert Rev Mol Med*. 2008;10:e3.
42. Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J Clin Invest*. 1998;101(12):2622-9.
43. Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(8):2951-6.
44. Jonard S, Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum Reprod Update*. 2004;10(2):107-17.
45. Franks S, Starke J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2008;14(4):367-78.
46. Blank SK, McCartney CR, Marshall JC. The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2006;12(4):351-61.
47. Legro RS, Kunselman AR, Dodson WC, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(1):165-9.
48. Gambineri A, Pelusi C, Manicardi E i sur. Glucose intolerance in a large cohort of mediterranean women with polycystic ovary syndrome: phenotype and associated factors. *Diabetes*. 2004;53(9):2353-8.
49. Dunaif A. Insulin Resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implicationf for pathogenesis. *Endocr Rev*. 1997;18(6):774-800.

50. Dunaif A, Wu X, Lee A, Diamanti-Kandarakis E. Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281(2):E392-9.
51. Baillargeon JP, Carpentier A. Role of insulin in the hyperandrogenism of lean women with polycystic ovary syndrome and normal insulin sensitivity. *Fertil Steril.* 2007;88(4):886-93.
52. Hoeger KM, Oberfield SE. Do women with PCOS have a unique predisposition to obesity? *Fertil Steril.* 2012;97(1): 13-7.
53. Escobar-Morreale HF, San Millan JL. Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metabol* 2007;18(7):266-272.
54. Li X and Lin JF. Clinical features, hormonal profile, and metabolic abnormalities of obese women with obese polycystic ovary syndrome. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2005;85(46): 3266-71.
55. Homburg R. Androgen excess of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2009;24(7):1548-55.
56. Juoula M, Saarikoski LA, Viikari JS, Oikonen M, Lehtimäki T, Lyytikäinen LP et al. A longitudinal analysis on associations of adiponectin levels with metabolic syndrome and carotid artery intima-media thickness. The cardiovascular risk in young Finns study. *Atherosclerosis.* 2011;217(1):234-9.
57. Lu HL, Wang HW, Wen Y, Zhang MX, Lin HH. Roles of adipocyte derived hormone adiponectin and resistin in insulin resistance of type 2 diabetes. *World J Gastroenterol.* 2006;12(11):1747-51.
58. Jaquet D, Gaboriau A, Czernichow P, Levy-Marchal C. Insulin resistance early in adulthood in subjects born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(4):1401-6.
59. Ibanez L, Lopez-Bermejo A, Diaz M, de Zegher F. Catch-up growth in girls born small for gestational age precedes childhood to high adiposity. *Fertil Steril.* 2011; 96(1):220-3.
60. Wild S, Pierpoint T, McKeigue P, Jacobs H. Cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. *Clin Endocrinol.* 2000;52(5):595–600.
61. Legro RS, Kusanman AR, Dunaif A. Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Med.* 2001;111(8):607–13.

62. Talbott EO, Zborowski JV, Rager JR, Boudreaux MY, Edmundowicz DA, Guzick DS. Evidence for an association between metabolic cardiovascular syndrome and coronary and aortic calcification among women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5454-61.
63. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care.* 1999;22(1):141-6.
64. Iftikhar S, Collazo-Clavell ML, Roger VL, St Sauver J, Brown RD Jr, Cha S, et al. Risk of cardiovascular events in patients with polycystic ovary syndrome. *Neth J Med.* 2012;70(2):74-80.
65. Pfeifer SM and Kives S. Polycystic ovary syndrome in the adolescent. *Obstet Gynecol Clin N Am.* 2009; 36(1): 129-52.
66. Essah PA, Wickham EP, Nestler JE. The metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol.* 2007; 50(1): 205-25.
67. Barber TM and Frank S. The link between polycystic ovary syndrome and both type 1 and type 2 diabetes mellitus: what do we know today? *Womens Health (Lond Engl).* 2012; 8(2): 147-54.
68. Hoeger KM. Role of lifestyle modification in the management of polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006;20(2):293-310.
69. Yildizhan R, Gokce AI, Yildizhan B, Cim N. Comparison of the effects of chlormadinone acetate versus drospirenone containing oral contraceptives on metabolic and hormonal parameters in women with PCOS for a period of two-year follow-up. *Gynecol Endocrinol.* 2015;31(5):396-400.
70. Baldani D. Chronic anovulation – polycystic ovary syndrome. In: Šimunić V, editor. *Reproductive Endocrinology and Infertility.* Zagreb: Školska knjiga; 2012. p.275-296.
71. Shaw RW. Tests of the hypothalamic–pituitary–ovarian axis. *Clin Obstet Gynaecol.* 1976; 3(3):485–503.
72. Wu CH and Winkel CA. The effect of therapy initiation day on clomiphene citrate therapy. *Fertil Steril.* 1989;52(4):564–8.
73. Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC. Predictors of patients remaining anovulatory during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhoeic infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(7):2361–5.

74. Messinis IE. Clomiphene citrate. In: Tarlatzis B, editor. Ovulation induction. Paris: Elsevier; 2002. p. 87–97.
75. Wramsby H, Fredga K, Liedholm P. Chromosome analysis of human oocytes recovered from preovulatory follicles in stimulated cycles. *N Engl J Med.* 1987; 316(3):121–4.
76. Homburg R, Armar NA, Eshel A, Adams J, Jacobs HS. Influence of serum luteinising hormone concentrations on ovulation, conception, and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome. *BMJ.* 1988; 297(6655):1024–6.
77. Messinis IE, Milingos SD. Current and future status of ovulation induction in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 1997;3(3):235–53.
78. Adashi EY. Ovulation induction: clomiphene citrate. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, editors. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology.* Philadelphia/New York: Lippincott–Raven; 1996. p.1181–206.
79. Wang CF, Gemzell C. The use of human gonadotropins for the induction of ovulation in women with polycystic ovarian disease. *Fertil Steril.* 1980; 33(5):479–86.
80. Franks S, White D. Low-dose gonadotrophin treatment in polycystic ovary syndrome: the step-up protocol. In Tarlatzis B, editor. *Ovulation Induction.* Paris: Elsevier; 2002. p. 98–107.
81. Brown J, Farquhar C, Beck J, Boothroyd C, Hughes E. Clomiphene and anti-oestrogens for ovulation induction in PCOS. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(4): CD002249.
82. Moll E, Korevaar JC, Bossuyt PM, van der Veen F. Does adding metformin to clomifene citrate lead to higher pregnancy rates in a subset of women with polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod.* 2008;23(8):1830–4.
83. Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. *Hum Reprod.* 2008;23(3):462-77.
84. Mitwally MF, Casper RF. Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. *Fertil Steril.* 2001; 75(2):305–9.
85. Costello MF, Eden JA. A systematic review of the reproductive system effects of metformin in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2003;79(1):1–13.
86. Lord JM, Flight IH, Norman RJ. Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2003;327(7421):951–3.

87. Moll E, Bossuyt PM, Korevaar JC, Lambalk CB, van der Veen F. Effect of clomifene citrate plus metformin and clomifene citrate plus placebo on induction of ovulation in women with newly diagnosed polycystic ovary syndrome: randomised double blind clinical trial. *BMJ*. 2006;332(7556):1485.
88. Polson DW, Mason HD, Saldahna MB, Franks S. Ovulation of a single dominant follicle during treatment with low-dose pulsatile follicle stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1987;26(2):205–12.
89. Homburg R, Howles CM. Low-dose FSH therapy for anovulatory infertility associated with polycystic ovary syndrome: rationale, results, reflections and refinements. *Hum Reprod Update*. 1999; 5(5):493–9.
90. Sagle MA, Hamilton-Fairley D, Kiddy DS, Franks S. A comparative, randomized study of low-dose human menopausal gonadotropin and follicle-stimulating hormone in women with polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril*. 1991;55(1):56–60.
91. Coelingh Bennink HJ, Fauser BC, Out HJ. Recombinant follicle-stimulating hormone (FSH; Puregon) is more efficient than urinary FSH (Metrodin) in women with clomiphene citrate-resistant, normogonadotropic, chronic anovulation: a prospective, multicenter, assessor-blind, randomized, clinical trial. European Puregon Collaborative Anovulation Study Group. *Fertil Steril*. 1998;69(1):19–25.
92. Macklon NS, Fauser BC. The step-down protocol. In Tarlatzis B, editor. *Ovulation induction*. Paris: Elsevier; 2002. p. 108–18.
93. Van Santbrink EJ, Donderwinkel PF, van Dessel TJ, Fauser BC. Gonadotrophin induction of ovulation using a step-down dose regimen: single-centre clinical experience in 82 patients. *Hum Reprod*. 1995; 10(5):1048–53.
94. Eijkemans MJ, Imani B, Mulders AG, Habbema JD, Fauser BC. High singleton live birth rate following classical ovulation induction in normogonadotrophic anovulatory infertility (WHO 2). *Hum Reprod*. 2003;18(11):2357–62.
95. Scheele F, Hompes PG, van der Meer M, Schoute E, Schoemaker J. The effects of a gonadotrophin-releasing hormone agonist on treatment with low dose follicle stimulating hormone in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 1993;8(5):699–704.
96. Filicori M, Flamigni C, Meriggiola MC, Ferrari P, Michelacci L, Campaniello E, et al. Endocrine response determines the clinical outcome of pulsatile gonadotropin-releasing hormone ovulation induction in different ovulatory disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;72(5):965–72.

97. Amer SA, Li TC, Ledger WL. Ovulation induction using laparoscopic ovarian drilling in women with polycystic ovarian syndrome: predictors of success. *Hum Reprod.* 2004; 19(8):1719–24.
98. Amer SA, Gopalan V, Li TC, Ledger WL, Cooke ID. Long term follow-up of patients with polycystic ovarian syndrome after laparoscopic ovarian drilling: clinical outcome. *Hum Reprod.* 2002; 17(8):2035–42.
99. <http://www.indiamart.com/sevana-hospital/laprosopic-surgeries.html>
100. Farquhar C, Vandekerckhove P, Lilford R. Laparoscopic “drilling” by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001;(4):CD001122.
101. Saravelos H, Li TC. Post-operative adhesions after laparoscopic electrosurgical treatment for polycystic ovarian syndrome with the application of Interceed to one ovary: a prospective randomized controlled study. *Hum Reprod.* 1996;11(5):992–7.
102. Pirwany I, Tulandi T. Laparoscopic treatment of polycystic ovaries: is it time to relinquish the procedure? *Fertil Steril.* 2003;80(2):241–251.
103. Buyalos RP, Lee CT. Polycystic ovary syndrome: pathophysiology and outcome with in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1996;65(1):1-10.
104. Tarlatzis BC, Grimbizis G. The significance of high follicular phase luteinising hormone levels in the treatment of woman with polycystic ovary syndrome by in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 1997;14(1):1-4.
105. Mathur RS, Akande AV, Keay SD, Hunt LP, Jenkins JM. Distinction between early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 2000;73(5):901–7.
106. Papanikolaou EG, Pozzobon C, Kolibianakis EM, Camus M, Tournaye H, Fatemi HM, et al. Incidence and prediction of ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing gonadotropin-releasing hormone antagonist in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2006;85(1):112–20.
107. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2008; 90 Suppl 5: S188–93.
108. Cluroe AD and Synek BJ. A fatal case of ovarian hyperstimulation syndrome with cerebral infarction. *Pathology.* 1995;27(4): 344-6.
109. Serour GI, Aboulghar M, Mansour R, Sattar MA, Amin Y, Aboulghar H. Complications of medically assisted conception in 3,500 cycles. *Fertil. Steril.* 1998; 70(4):638-42.

110. Brinsden PR, Wada I, Tan SL, Balen A, Jacobs H.S. Diagnosis, prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995; 102(10):767-72.
111. Schenker JG, Ezra Y. Complications of assisted reproductive techniques. *Fertil. Steril.* 1994;61(3), 411-22.
112. Golan A, Ron-El R, Herman A, Soffer Y, Weinraub Z, Caspi E. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstet Gynecol Surv.* 1989;44(6): 430-40.
113. Morris RS, Wong IL, Kirkman E, Gentschein E, Paulson RJ. Inhibition of ovarian-derived prorenin to angiotensin cascade in the treatment of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 1995;10(6):1355-8.
114. Navot D, Relou A, Birkenfeld A, Rabinowitz R, Brzezinski A, Margalioth EJ. Risk factors and prognostic variables in the ovarian hyperstimulation syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159(1):210-5.
115. Delvigne A, Demoulin A, Smitz J, Donnez J, Koninckx P, Dhont M, et al. The ovarian hyperstimulation syndrome in in-vitro fertilization: a Belgian multicentric study. I. Clinical and biological features. *Hum Reprod.* 1993;8(9):1353-60.
116. Shulman A, Dor J. In vitro fertilization treatment in patients with polycystic ovaries. *J Assist Reprod Genet.* 1997;14(1):7-10.
117. Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J Pathol.* 1995;146(1):157-65.
118. Sher G, Zouves C, Feinman M, Maassarani G. Prolonged coasting: an effective method for preventing severe ovarian hyperstimulation syndrome in patients undergoing in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1995;10(1):3107-9.
119. Benadiva CA, Davis O, Kligman I, Moomjy M, Liu HC, Rosenwaks Z. Withholding gonadotrophin administration is an effective alternative for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 1997;67(4):724-7.
120. Rabau E, David A, Serr DM, Mashiach S, Lunenfeld B. Human menopausal gonadotropins for anovulation and sterility. Results of 7 years of treatment. *Am J Obstet Gynecol.* 1967;98(1):92-8.
121. Schenker JG, Weinstein D. Ovarian hyperstimulation syndrome: a current survey. *Fertil Steril.* 1978;30(3):255-68.

122. Navot D, Bergh PA, Laufer N. Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment. *Fertil Steril*. 1992;58(2):249-61.
123. Rizk B, Aboulghar MA. Classification, pathophysiology and management of ovarian hyperstimulation syndrome. In: Brinsden P, editor. *In-Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*. New York, London: The Parthenon Publishing Group; 1999. p. 131-55.
124. Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M. Gonadotrophin- releasing hormone antagonists for assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(3): CD001750.
125. Kolibianakis EM, Collins J, Tarlatzis BC, Devroey P, Diedrich K, Griesinger G. Among patients treated for IVF with gonadotrophins and GnRH analogues, is the probability of live birth dependent on the type of analogue used? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6):651–71.
126. Costello MF, Chapman M, Conway U. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2006;21(6):1387–99.
127. Delvigne A, Rozenberg S. A qualitative systematic review of coasting, a procedure to avoid ovarian hyperstimulation syndrome in IVF patients. *Hum Reprod Update*. 2002;8(3):291–6.
128. Delvigne A, Rozenberg S. Preventive attitude of physicians to avoid OHSS in IVF patients. *Hum Reprod*. 2001;16(12):2491–5.
129. Schmidt DW, Maier DB, Nulsen JC, Benadiva CA. Reducing the dose of human chorionic gonadotropin in high responders does not affect the outcomes of in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004;82(4):841–6.
130. Kolibianakis EM, Papanikolaou EG, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem AC, Devroey P. Triggering final oocyte maturation using different doses of human chorionic gonadotropin: a randomized pilot study in patients with polycystic ovary syndrome treated with gonadotropin-releasing hormone antagonists and recombinant follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril*. 2007;88(5):1382–8.
131. Kashyap S, Leveille M, Wells G. Low dose hCG reduces the incidence of early and severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2006;86 Suppl 2: S182–3.
132. Wada I, Matson PL, Troup SA, Morroll DR, Hunt L, Lieberman BA. Does elective cryopreservation of all embryos from women at risk of ovarian hyperstimulation

- syndrome reduce the incidence of the condition? *Br J Obstet Gynaecol.* 1993;100(3): 265–9.
133. Damewood MD, Shen W, Zacur HA, Schlaff WD, Rock JA, Wallach EE. Disappearance of exogenously administered human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril.* 1989;52(3):398–400.
 134. Itskovitz J, Boldes R, Levron J, Erlik Y, Kahana L, Brandes JM. Induction of preovulatory luteinizing hormone surge and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome by gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril.* 1991;56(2): 213–20.
 135. Al-Inany HG, Aboulghar M, Mansour R, Proctor M. Recombinant versus urinary human chorionic gonadotrophin for ovulation induction in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005;(2):CD003719.
 136. Babayof R, Margalioth EJ, Huleihel M, Amash A, Zylber-Haran E, Gal M, et al. Serum inhibin A, VEGF and TNFalpha levels after triggering oocyte maturation with GnRH agonist compared with HCG in women with polycystic ovaries undergoing IVF treatment: a prospective randomized trial. *Hum Reprod.* 2006;21(5):1260–5.
 137. Engmann L, DiLuigi A, Schmidt D, Nulsen J, Maier D, Benadiva C. The use of gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist to induce oocyte maturation after cotreatment with GnRH antagonist in high-risk patients undergoing in vitro fertilization prevents the risk of ovarian hyperstimulation syndrome: a prospective randomized controlled study. *Fertil Steril.* 2008;89(1):84–91.
 138. Shapiro DB, Mitchell-Leef D, Carter M, Nagy ZP. Ganirelix acetate use in normal- and poorprognosis patients and the impact of estradiol patterns. *Fertil Steril.* 2005;83(3):666–70.
 139. Isikoglu M, Berkkanoglu M, Senturk Z, Ozgur K. Human albumin does not prevent ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproductive technology programe: a prospective randomized placebo controlled blind study. *Fertil Steril.* 2007;88(4): 982–5.
 140. Gonen Y, Powell WA, Casper RF. Effect of follicular aspiration on hormonal parameters in patients undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod.* 1991;6(3): 356–8.
 141. Vrtovec HM, Tomažević T. Preventing severe ovarian hyperstimulation syndrome in in vitro fertilization/embryo transfer program. Use of follicular aspiration after human chorionic gonadotropin administration. *J Reprod Med.* 1995;40(1):37-40.

142. Whelan JG 3rd, Vlahos NF. The ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 2000;73(5):883–96.
143. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 2008;90(5):S188–93.
144. Victorino GP, Newton CR, Curran B. Effect of hypertonic saline on microvascular permeability in the activated endothelium. *J Surg Res.* 2003;112(1):79–83.
145. Ferraretti AP, Gianaroli L, Diotallevi L, Festi C, Trounson A. Dopamine treatment for severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 1992;7(2):180–3.
146. Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, et al. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med.* 2001;7(5):569-74.
147. Alvarez C, Marti-Bonmati L, Novella-Maestre E, Sanz R, Gomez R, Fernandez-Sanchez M, et al. Dopamine agonist cabergoline reduces hemoconcentration and ascites in hyperstimulated women undergoing assisted reproduction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(8):2931-7.
148. Alvarez C, Alonso-Muriel I, Garcia G, Crespo J, Bellver J, Simon C, et al. Implantation is apparently unaffected by the dopamine agonist cabergoline when administered to prevent ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing assisted reproduction treatment: a pilot study. *Hum Reprod.* 2007;22(12):3210-4.
149. Youssef MA, van Wely M, Hassan MA, Al-Inany HG, Mochtar M, Khattab S, et al. Can dopamine agonists reduce the incidence and severity of OHSS in IVF/ICSI treatment cycles? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2010;16(5):459-66.
150. Chen CD, Yang JH, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Effects of repeated abdominal paracentesis on uterine and intraovarian haemodynamics and pregnancy outcome in severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 1998;13(8):2077-81.
151. Macklon N, Pieters M. Indications for IVF treatment: from diagnosis to prognosis. In: Gardner D, editor. *Textbook of assisted reproductive techniques.* London: Informa; 2001. p.23-31.
152. Coomarasamy A, Afran M, Cheema D, van der Veen F, Bossuyt PM, van Wely M. Urinary hMG versus rFSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2008;23(2):310-5.

153. Albuquerque LE, Sacontó H, Maciel MC. Depot versus daily administration of gonadotropin releasing hormone agonist protocol for pituitary desensitization in assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(3):CD002808.
154. Griesinger G, Felberbaum R, Diedrich K. GnRH antagonist in ovarian stimulation: a treatment regimen of clinicians second choice? Data from the German national IVF registry. *Hum Reprod.* 2005;20(9):2373-5.
155. Sykes D, Out HJ, Palmer SJ, van Loon J. The cost effectiveness of IVF in UK: a comparison of three gonadotropin treatment. *Hum Reprod.* 2001;16(12):2557-62.
156. Khalaf Y, Taylor A, Braude P. Low serum estradiol concentrations after five days of controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization are associated with poor outcome. *Fertil Steril.* 2000;74(1):63-6.
157. Hildebrandt NB, Host E, Mikkelsen AL. Pain experience during transvaginal aspiration of immature oocytes. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001;80(11): 1043-5.
158. Ginoroli L, Plachot M, van Kooij R, Al-Hasani S, Dawson K, DeVos A, et al. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. Committee of the Special Interest Group on Embryology of the European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod.* 2000;15(10):2241-6.
159. Hwang JL, Lin YH, Tsai YL. In vitro fertilization and maturation of immature oocytes: A comparative study of fertilization techniques. *J Assist Reprod Genet.* 2000;17(1):39-43.
160. Thurin A, Hausken J, Hillensjo T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, et al. Elective single embryo transfer in in vitro fertilization. *N Engl J Med.* 2004;351(23): 2392-402.
161. Neubourg DD, Mangelshots K, Van Royen E, Vercruyssen M, Ryckaert G, Valkenburg M, et al. Impact of patient's choice for single embryotransfer of a top quality embryo versus double transfer in the first IVF/ICSI cycle. *Hum Reprod.* 2002;17(10):2621-5.
162. Tavaniotou A, Smitz J, Bourgain C, Devroey P. Comparison between different routes of progesterone administration as luteal phase support in infertility treatments. *Hum Reprod Update.* 2000;6(2):139-148.
163. Strehler E, Abt M, El Danasouri I, De Santo M, Sterzik K. Impact of recombinant follicle-stimulating hormone and human menopausal gonadotropins on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril.* 2001;75(2):332-6.

164. Akande VA, Fleming CF, Hunt LP, Keay SD, Jenkins JM. Biological versus chronological ageing of oocytes, distinguishable by raised FSH levels in relation to the success of IVF treatment. *Human Reproduction* 2002;17(8):2003-8.
165. Heijnen EM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Laven JS, Macklon NS, Fauser BC. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2006;12(1):13-21.
166. Kodama H, Fukuda J, Karube H, Matsui T, Shimizu Y, Tanaka T. High incidence of embryo transfer cancellations in patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod*. 1995;10(8):1962-7.
167. MacDougall MJ, Tan SL, Jacobs HS. In vitro fertilization and the ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod*. 1992;7(5):597-600.
168. Balen AH, Tan SL, Jacobs HS. Hypersecretion of luteinising hormone: a significant cause of infertility and miscarriage. *Br J Obstet Gynecol*. 1993;100(12):1082-9.
169. Homburg R, Levy T, Berkovitz D, Farchi J, Feldberg D, Ashkenazi J, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist reduces the miscarriage rate for pregnancies achieved in women with polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril*. 1993;59(3):527-31.
170. Dor J, Shulman A, Levran D, Ben-Rafael Z, Rudak E, Mashiach S. The treatment of patients with polycystic ovarian syndrome by in-vitro fertilization and embryo transfer: A comparison of results with those of patients with tubal infertility. *Hum Reprod* 1990;5(7):816-8.
171. Yan J, Wu K, Tang R, Ding L, Chen ZJ. Effect of maternal age on the outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Sci China Life Sci*. 2012;55(8):694-8.
172. Mulders AG, Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, Fauser BC. IVF outcome in anovulatory infertility (WHO group 2) including polycystic ovary syndrome following previous unsuccessful ovulation induction. *Reprod Biomed Online*. 2003;7(1):50-8.
173. Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC. Predictors of chances to conceive in ovulatory patients during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhoeic infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(5):1617-22.

174. Nardo LG, Rai R, Backos M, El Gaddal S, Regan L. High serum luteinizing hormone and testosterone concentrations do not predict pregnancy outcome in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* 2002;77(2):348–52.
175. Wong IL, Morris RS, Lobo RA, Paulson RJ, Sauer MV. Isolated polycystic morphology in ovum donors predicts response to ovarian stimulation. *Hum Reprod.* 1995;10(3):524–8.
176. Damario MA, Barmat L, Liu HC, Davis OK, Rosenwaks Z. Dual suppression with oral contraceptives and gonadotrophin releasing-hormone agonists improves in-vitro fertilization outcome in high responder patients. *Hum Reprod.* 1997;12(11):2359-65.
177. Gibson M. Reproductive health and polycystic ovary syndrome. *Am J Med.* 1995;98(1A):67S-75S.
178. Cano F, Garcia-Velasco JA, Millet A, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Oocyte quality in polycystic ovaries revisited: identification of a particular subgroup of women. *J Assist Reprod Genet.* 1997;14(5):254-61.
179. Sahu B, Ozturk O, Ranierra M, Serhal P. Comparison of oocyte quality and intracytoplasmic sperm injection outcome in women with isolated polycystic ovaries or polycystic ovarian syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2008;277(3):239- 44.
180. Okonofua FE, Onwudiegwu U, Smith W, Thomas N, Craft I, Dandona F. Correlation of ultrasound assessment of endometrial growth and plasma steroid concentration during superovulation for in vitro fertilization. *Afr J Med Med Sci.* 1993;22(1):89-93.
181. Laven JS, Fauser BC. Inhibins and adult ovarian function. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;225(1-2):37–44.
182. Sengoku K, Tamate K, Takuma N, Yoshida T, Goishi K , Ishikawa M. The chromosomal normality of unfertilized oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 1997;12(3):474–7.
183. Dor J, Shulman A, Pariente C, Levran D, Bider D, Menashe Y, et. al. The effect of gonadotropin-releasing hormone agonist on the ovarian response and in vitro fertilization results in polycystic ovarian syndrome: a prospective study. *Fertil Steril.* 1992;57(2):366-71.
184. Franks S. The treatment of patients with polycystic ovaries undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet.* 1997;14(1):12-4.
185. MacDougall MJ, Tan SL, Balen A, Jacobs HS. A controlled study comparing patients with and without polycystic ovaries undergoing in vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1993;8(2):233-7.

186. Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqui A, Tesquier A, Serkine AM, et al. Oocyte and embryo quality in polycystic ovary syndrome. *Gynecol Obstet Fertil.* 2003;31(4):350-4.
187. Esinler I, Bayar U, Bozdag G, Yarali H. Outcome of intracytoplasmic sperm injection in patients with polycystic ovary syndrome or isolated polycystic ovaries. *Fertil Steril.* 2005;84(4):932-7.
188. Okohue JE, Onuh SO, Ikimalo JI. Comparison of IVF/ICSI outcome in patients with polycystic ovarian syndrome or tubal factor infertility. *Niger J Clin Pract.* 2013;16(2):207-10.
189. Dale PO, Tanbo T, Abyholm T. In-vitro fertilization in infertile women with the polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 1991;6(2):238-41.
190. Homburg R, Berkowitz D, Levy T, Feldberg D, Ashkenazi J, Ben-Rafael Z. In vitro fertilization and embryo transfer for the treatment of infertility associated with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 1993;60(5):858-61.
191. Glueck CJ, Wang P, Fontaine RN, Sieve-Smith L, Tracy T, Moore SK. Plasminogen activator inhibitor activity: an independent risk factor for the high miscarriage rate during pregnancy in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism.* 1999;48(12):1589-95.
192. Homburg R. Adverse effects of luteinizing hormone on fertility: fact or fantasy. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1998;12(4):555-63.
193. Agrawal R, Tan SL, Wild S, Sladkevicius P, Engmann L, Payne N, et al. Serum vascular endothelial growth factor concentrations in in vitro fertilization cycles predict the risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 1999;71(2):287-93.
194. Dal Prato L, Borini A. Use of antagonists in ovarian stimulation protocols. *Reprod Biomed Online.* 2005;10(3):330-8.
195. Rutherford AJ, Subak-Sharpe RJ, Dawson KJ, Margara RA, Franks S, Winston RM. Improvement of in vitro fertilisation after treatment with buserelin, an agonist of luteinising hormone releasing hormone. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1988;296(6639):1765-8.
196. Frydman R, Parneix I, Belaisch-Allart J, Forman R, Hazout A, Fernandez H, Testart J. LHRH agonists in IVF: different methods of utilization and comparison with previous ovulation stimulation treatments. *Hum Reprod.* 1988;3(4):559-61.

197. Fleming R, Coutts JR. LHRH analogues for ovulation induction, with particular reference to polycystic ovary syndrome. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1988;2(3): 677–87.
198. Fleming R, Jamieson ME, Hamilton MP, Black WP, Macnaughton MC, Coutts JR. The use of GnRH analogues in combination with exogenous gonadotropins in infertile women. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh).* 1988;288:77–84.
199. Abdalla HI, Ahuja KK, Leonard T, Morris NN, Honour JW, Jacobs HS. Comparative trial of luteinizing hormone-releasing hormone analog/human menopausal gonadotropin and clomiphene citrate/human menopausal gonadotropin in an assisted conception program. *Fertil Steril.* 1990;53(3):473–8.
200. Salat-Baroux J, Antoine JM. Accidental hyperstimulation during ovulation induction. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1990;4(3): 627–37.
201. Salat-Baroux J, Alvarez S, Antonie JM, Tibi C, Cornet D, Mandelbaum J, et al. Comparison between long and short protocols of LHRH agonist in the treatment of polycystic ovary disease by in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1988;3(4):535–9.
202. Tan SL, Kingsland C, Campbell S, Mills C, Bradfield J, Alexander N, et al. The long protocol of administration of gonadotropin-releasing hormone agonist is superior to the short protocol for ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1992; 57(4): 810–4.
203. Jones GS, Garcia JE, Rosenwaks Z. The role of pituitary gonadotropins in follicular stimulation and oocyte maturation in the human. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984; 59(1): 178–80.
204. Couzinet B, Lestrat N, Brailly S, Forest M, Schaison G. Stimulation of ovarian follicular maturation with pure follicle-stimulating hormone in women with gonadotropin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;66(3):552–6.
205. Shoham Z, Balen A, Patel A, Jacobs HS. Results of ovulation induction using human menopausal gonadotropin or purified follicle-stimulating hormone in hypogonadotropic hypogonadism patients. *Fertil Steril.* 1991;56(6):1048–53.
206. Homburg R, Eshel A, Kilborn J, Adams J, Jacobs HS. Combined luteinizing hormone releasing hormone analogue and exogenous gonadotrophins for the treatment of infertility associated with polycystic ovaries. *Hum Reprod.* 1990;5(1):32–5.
207. Tang T, Balen AH. Polycystic ovaries and ART . In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, editors. *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, 3th ed, London: Informa Healthcare; 2009. p. 724- 726.

208. Out HJ, Mannaerts BM, Driessen SG, Bennink HJ. A prospective, randomized, assessor-blind, multicentre study comparing recombinant and urinary follicle stimulating hormone (Puregon versus Metrodin) in in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1995;10(10):2534–40.
209. Teissier MP, Chable H, Paulhac S, Aubard Y. Recombinant human follicle stimulating hormone versus human menopausal gonadotrophin induction: effects in mature follicle endocrinology. *Hum Reprod.* 1999;14(9):2236–41.
210. Van Wely M, Westergaard LG, Bossuyt PM, van der Veen F. Effectiveness of human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle-stimulating hormone for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2003;80(5):1086–93.
211. Andersen AN, Devroey P, Arce JC. Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial. *Hum Reprod.* 2006;21(12):3217–27.
212. Figen Turkcapar A, Seckin B, Onalan G, Ozdener T, Batioglu S. Human Menopausal Gonadotropin versus Recombinant FSH in Polycystic Ovary Syndrome Patients Undergoing In Vitro Fertilization. *Int J Fertil Steril.* 2013;6(4):238-43.
213. European and Middle East Orgalutran Study Group. Comparable clinical outcome using the GnRH antagonist ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH surges in women undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod.* 2001;16(4): 644–51.
214. European Recombinant LH Study Group. Human recombinant luteinizing hormone is as effective as, but safer than, urinary human chorionic gonadotropin in inducing final follicular maturation and ovulation in in vitro fertilization procedures: results of a multicenter double-blind study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(6): 2607–18.
215. Olivennes F, Fanchin R, Bourchard P, Taieb J, Frydman R. Triggering of ovulation by a gonado-tropin-releasing hormone (GnRH) agonist in patients pretreated with a GnRH antagonist. *Fertil Steril.* 1996;66(1):151–3.
216. Engmann L, Siano L, Schmidt D, Nulsen J, Maier D, Benadiva C. GnRH agonist to induce oocyte maturation during IVF in patients at high risk of OHSS. *Reprod Biomed Online.* 2006;13(5):639–44.
217. Acevedo B, Gomez-Palomares JL, Ricciarelli E, Hernandez ER. Triggering ovulation with gonadotropin-releasing hormone agonists does not compromise embryo implantation rates. *Fertil Steril.* 2006;86(6):1682–7.

218. Singh N, Naha M, Malhotra N, Lata K, Vanamail P, Tiwari A. Comparison of gonadotropin-releasing hormone agonist with GnRH antagonist in polycystic ovary syndrome patients undergoing in vitro fertilization cycle: Retrospective analysis from a tertiary center and review of literature. *J Hum Reprod Sci.* 2014;7(1):52-7.
219. Lin H, Li Y, Li L, Wang W, Yang D, Zhang Q. Is a GnRH antagonist protocol better in PCOS patients? A meta-analysis of RCTs. *PLoS One.* 2014;9(3):e91796.
220. Xiao J, Chen S, Zhang C, Chang S. Effectiveness of GnRH antagonist in the treatment of patients with polycystic ovary syndrome undergoing IVF: a systematic review and meta analysis. *Gynecol Endocrinol.* 2013;29(3):187-91.
221. Griesinger G, Diedrich K, Tarlatzis BC, Kolibianakis EM. GnRH-antagonists in ovarian stimulation for IVF in patients with poor response to gonadotrophins, polycystic ovary syndrome, and risk of ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2006;13(5):628-38.
222. Kurzawa R, Ciepela P, Baczkowski T, Safranow K, Brelik P. Comparison of embryological and clinical outcome in GnRH antagonist vs. GnRH agonist protocols for in vitro fertilization in PCOS non-obese patients. A prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet.* 2008;25(8):365-74.
223. Huang SY, Huang HY, Yu HT, Wang HS, Chen CK, Lee CL, et al. Low-dose GnRH antagonist protocol is as effective as the long GnRH agonist protocol in unselected patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2011;50(4):432-5.
224. Al-Inany H, Aboulghar M. GnRH antagonist in assisted reproduction: a Cochrane review. *Hum Reprod.* 2002;17(4):874-85.
225. Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;(3):CD001750.
226. Al-Inany HG, Youssef MA, Aboulghar M, Broekmans F, Sterrenburg M, Smit J, et al. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;(5):CD001750.
227. Pundir J, Sunkara SK, El-Toukhy T, Khalaf Y. Meta-analysis of GnRH antagonist protocols: do they reduce the risk of OHSS in PCOS? *Reprod Biomed Online.* 2012;24(1):6-22.
228. Barbieri RL. Metformin for the treatment of polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol.* 2003;101(4):785-93.

229. Tang T, Lord JM, Norman RJ, Yasmin E, Balen AH. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiroinositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;(1):CD003053.
230. Creanga AA, Bradley HM, McCormick C, Witkop CT. Use of metformin in polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2008;111(4):959–68.
231. Palomba S, Pasquali R, Orsi Jr F, Nestler JE. Clomiphene citrate, metformin or both as first-step approach in treating anovulatory infertility in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review of head-to-head randomized controlled studies and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;70(2):311–21.
232. Tang T, Glanville J, Orsi N, Barth JH, Balen AH. The use of metformin for women with PCOS undergoing IVF treatment. *Hum Reprod.* 2006;21(6):1416–25.
233. Kjotrod SB, Carlsen SM, Rasmussen PE, Holst-Larsen T, Mellembakken J, Thurin-Kjellberg A, et al. Use of metformin before and during assisted reproductive technology in non-obese young infertile women with polycystic ovary syndrome: a prospective, randomized, double-blind, multi-centre study. *Hum Reprod.* 2011;26(8):2045–53.
234. Kjotrod SB, von Düring V, Carlsen SM. Metformin treatment before IVF/ICSI in women with polycystic ovary syndrome; a prospective, randomized, double blind study. *Hum Reprod.* 2004;19(6):1315–22.
235. Palomba S, Falbo A, La Sala GB. Effects of metformin in women with polycystic ovary syndrome treated with gonadotrophins for in vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection cycles: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BJOG.* 2013;120(3):267–76.
236. Teissier MP, Chable H, Paulhac S, Aubard Y. Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability. *Hum Reprod.* 2000;15(12):2471–7.
237. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996;17(2):121–55.
238. Fanchin R, de Ziegler D, Taieb J, Olivennes F, Castracane VD, Frydman R. Human chorionic gonadotropin administration does not increase plasma androgen levels in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril.* 2000;73(2):275–9.

239. La Marca A, Morgante G, Palumbo M, Cianci A, Petraglia F and De Leo V. Insulin-lowering treatment reduces aromatase activity in response to follicle-stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2002;78(6):1234–9.
240. Wang TH, Horng SG, Chang CL, Wu HM, Tsai YJ, Wang HS, et al. Human chorionic gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation syndrome is associated with up-regulation of vascular endothelial growth factor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(7):3300–8.
241. Miele C, Rochford JJ, Filippa N, Giorgetti-Peraldi S, Van Obberghen E. Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways. *J Biol Chem*. 2000;275(28):21695–702.
242. Fleming R, Harborne L, MacLaughlin DT, Ling D, Norman J, Sattar N, et al. Metformin reduces serum mullerian-inhibiting substance levels in women with polycystic ovary syndrome after protracted treatment. *Fertil Steril*. 2005;83(1):130–6.
243. Van Rooij IA, Broekmans FJ, Te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, De Jong FH, et al. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2002;17(12):3065–71.
244. Cook CL, Siow Y, Brenner AG, Fallat ME. Relationship between serum Mullerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril*. 2002;77(1):141–6.
245. Das M, Gillott DJ, Saridogan E, Djahanbakhch O. Anti-Mullerian hormone is increased in follicular fluid from unstimulated ovaries in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2008;23(9):2122–6.
246. La Marca A, Orvieto R, Giulini S, Jasonni VM, Volpe A, De Leo V. Mullerian-inhibiting substance in women with polycystic ovary syndrome: relationship with hormonal and metabolic characteristics. *Fertil Steril*. 2004;82(4):970–2.
247. Nardo LG, Yates AP, Roberts SA, Pemberton P, Laing I. The relationships between AMH, androgens, insulin resistance and basal ovarian follicular status in non-obese subfertile women with and without polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2009;24(11):2917–23.
248. Broer SL, Mol BW, Hendriks D, Broekmans FJ. The role of anti-Mullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril*. 2009;91(3):705–14.

249. Xi W, Gong F, Lu G. Correlation of serum Anti-Müllerian hormone concentrations on day 3 of the in vitro fertilization stimulation cycle with assisted reproduction outcome in polycystic ovary syndrome patients. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(5):397-402.
250. Van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJ, Habbema JD, Hompes PG, Michgelsen HW, et al. Predictive value of pregnancy history in subfertile couples: results from a nationwide cohort study in the Netherlands. *Fertil Steril.* 2008;90(3):521-7.
251. Brewer CJ, Balen AH. The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction.* 2010;140(3):347-64.
252. Linne Y. Effects of obesity on women's reproduction and complications during pregnancy. *Obes Rev.* 2004;5(3):137-43.
253. Matalliotakis I, Cakmak H, Sakkas D, Mahutte N, Koumantakis G, Arici A. Impact of body mass index on IVF and ICSI outcome: a retrospective study. *Reprod Biomed Online.* 2008;16(6):778-83.
254. Bailey AP, Hawkins LK, Missmer SA, Correia KF, Yanushpolsky EH. Effect of body mass index on in vitro fertilization outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;211(2):163.e1-6.
255. Orvieto R, Nahum R, Meltcer S, Homburg R, Rabinson J, Anteby EY, et al. Ovarian stimulation in polycystic ovary syndrome patients: the role of body mass index. *Reprod Biomed Online.* 2009;18(3):333-6.
256. Huang K, Liao X, Dong X, Zhang H. Effect of overweight/obesity on IVF-ET outcomes in chinese patients with polycystic ovary syndrome. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(12):5872-6.
257. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 2000;320(7251):1708-12.
258. Menken J, Trussell J, Larsen U. Age and infertility. *Science.* 1986;233(4771):1389-94.
259. Laufer N, Simon A, Samueloff A, Yaffe H, Milwidsky A, Gielchinsky Y. Successful spontaneous pregnancies in women older than 45 years. *Fertil Steril.* 2004;81(5):1328-32.
260. Dunson DB, Colombo B, Baird DD. Changes with age in the first level and duration of fertility in the menstrual cycle. *Hum Reprod.* 2002;17(5):1399-403.
261. Leridon H. Can assisted reproductive technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Hum Reprod.* 2004;19(7):1548-53.
262. Hecht CA, Hook EB. Rates of Down syndrome at livebirth by one-year maternal age intervals in studies with apparent close to complete ascertainment in populations of

- European origin: a proposed revised rate schedule for use in genetic and prenatal screening. *Am J Med Genet.* 1996;62(4):376-85.
263. Gnoth C, Maxrath B, Skonieczny T, et al. Final ART success rates: a 10 years survey. *Hum Reprod.* 2011;26(8):2239–46.
264. Hourvitz A, Machtinger R, Maman E, Baum M, Dor J, Levron J. Assisted reproduction in women over 40 years of age: how old is too old? *Reprod Biomed Online.* 2009;19(4):599–603.
265. Thum M Y, Abdalla HI, Taylor D. Relationship between women's age and basal follicle- stimulating hormone levels with aneuploidy risk in in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril.* 2008;90(2):315–21.
266. Griffiths A, Dyer SM, Lord SJ, Pardy C, Fraser IS, Eckermann S. A cost-effectiveness analysis of in-vitro fertilization by maternal age and number of treatment attempts. *Hum Reprod.* 2010;25(4):924–31.
267. Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet.* 1980;44(Pt 2): 151–78.

BIOGRAFIJA AUTORA

Milan S. Trenkić rođen je 06.03.1979. godine u Prokuplju. Živi i radi u Nišu. Osnovnu školu i srednju medicinsku školu "Dr Milenko Hadžić" sa odličnim uspehom završio je u Nišu. Medicinski fakultet, Univerziteta u Nišu upisao je školske 1998/99. godine. Studije medicine završio je 11. jula 2005. godine, sa opštim uspehom 9,19 (devetdevetnaest) i odbranio diplomski rad ocenom 10 (deset). Tokom studija učestvovao je na kongresima studenata medicine izlažući autorske radove.

Nakon obavljenog lekarskog staža u trajanju od godinu dana položio je stručni ispit za doktora medicine 31. jula 2006. godine u Beogradu. Radni odnos na neodređeno vreme u Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničnog centra u Nišu zasnovao je 10.11.2005. godine.

Nakon diplomiranja, 14.12.2005. godine upisao je magistarske (poslediplomske) studije iz oblasti ginekologije i akušerstva i položio sve ispite predviđene planom i programom predmeta. Rešenjem Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Nišu, 2008/09. godine odobrava mu se prelazak sa magistarskih na Akademske Doktorske Studije - odsek kliničke medicine.

Specijalističke studije iz ginekologije i akušerstva upisao je 13.11.2008. godine, a završio sa ocenom odličan 28.11.2012. godine. Tokom specijalizacije proveo je tri meseca u Kliničkom centru Srbije, u Klinici za urologiju. Takođe, u sklopu edukacije imao je više kratkotrajnih boravaka u Klinici za ginekologiju i akušerstvo, Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu gde se usavršavao iz oblasti humane reprodukcije i video histeroskopije.

U okviru stručnog usavršavanja boravio je 2009. godine u Univerzitetnoj bolnici " St. Luke's- Roosevelt Hospital Center" u okviru Columbia univerziteta za lekare i hirurge , gde je završio napredni kurs iz minimalno invazivne ginekologije i robotske hirurgije. Napredni trening program iz oblasti ginekološke onkološke endoskopije u trajanju od mesec dana završio je 2011. godine u "Galaxy CARE Laparoscopy Institute" u gradu Pune u Indiji.

Autor je i koautor više naučno istraživačkih radova štampanih u vodećim nacionalnim i svetskim časopisima. Član je Srpskog lekarskog društva, UGES-a (Udruženje za ginekološku endoskopiju Srbije) i član AAGL-a (Američkog udruženja za ginekološku laparoskopiju).

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Утицај протокола стимулације код полицистичног оваријалног синдрома

на исход вантелесног оплођења

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 07.06.2016.

Потпис аутора дисертације:



Др Милан С. Тренкић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације: Утицај протокола стимулације код полицистичног оваријалног синдрома на исход вантелесног оплођења

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 07.06.2016.

Потпис аутора дисертације:



Др Милан С. Тренкић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Утицај протокола стимулације код полицистичног оваријалног синдрома
на исход вантелесног оплођења

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 07.06.2016.

Потпис аутора дисертације:



Др Милан С. Тренкић