

Usporedba agonističkih i antagonističkih protokola u pacijentica s lošim odgovorom jajnika na prethodnu stimulaciju

Bušić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:408126>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Marija Bušić

**USPOREDBA AGONISTIČKIH I ANTAGONISTIČKIH PROTOKOLA U
PACIJENTICA S LOŠIM ODGOVOROM JAJNIKA NA PRETHODNU
STIMULACIJU**

Diplomski rad

Akadska godina 2016./2017.

Mentorica:

doc. dr. sc. Martina Šunj

Split, srpanj 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Marija Bušić

**USPOREDBA AGONISTIČKIH I ANTAGONISTIČKIH PROTOKOLA U
PACIJENTICA S LOŠIM ODGOVOROM JAJNIKA NA PRETHODNU
STIMULACIJU**

Diplomski rad

Akadska godina 2016./2017.

Mentorica:

doc. dr. sc. Martina Šunj

Split, srpanj 2017.

SADRŽAJ

1.	UVOD	5
1.1	MENSTRUACIJSKI CIKLUS	6
1.1.1.	OSOVINA HIPOTALAMUS – HIPOFIZA - JAJNIK.....	6
1.2.	NEPLODNOST.....	8
1.2.1.	ETIOLOGIJA NEPLODNOSTI	8
1.2.2.	DIJAGNOZA NEPLODNOSTI.....	9
1.3.	MEDICINSKI POMOGNUTA OPLODNJA	11
1.3.1.	METODE MEDICINSKI POMOGNUTE OPLODNJE	11
1.3.2.	INDIKACIJE ZA MEDICINSKI POTPOMOGNUTU OPLODNJU	12
1.3.3.	SLAB OVARIJSKI ODGOVOR	13
1.3.4.	OVARIJSKA STIMULACIJA	15
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	22
2.1.	HIPOTEZE.....	23
3.	MATERIJAL I METODE.....	24
4.	REZULTATI.....	28
5.	RASPRAVA.....	36
6.	ZAKLJUČCI.....	40
7.	POPIS CITIRANE LITERATURE.....	42
8.	SAŽETAK.....	46
9.	SUMMARY	48
10.	ŽIVOTOPIS	50

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Martini Šunj
na velikoj pomoći te na uloženom trudu i vremenu.
Hvala svima koji su mi pomogli svojom podrškom
i savjetima u pisanju ovog rada.*

POPIS KRATICA

AFC – broj antralnih folikula (eng. *antral follicle count*)

AMH – anti-Müllerov hormon

COH – kontrolirana hiperstimulacija jajnika (eng. *controlled ovarian hyperstimulation*)

FORT – stopa folikularnog rasta (eng. *follicular output rate*)

FSH – folikul stimulirajući hormon

GnRH – hormon koji oslobađa gonadotropine

HCG - humani korionski gonadotropin

HMG – humani menopauzalni gonadotropin

ICSI – intracitoplazmatska injekcija spermija

IVF – *in vitro* fertilizacija

LH – luteinizirajući hormon

MPO – medicinski pomognuta oplodnja

PCOS – sindrom policističnih jajnika (eng. *polycystic ovary syndrome*)

POR – slab odgovor jajnika (eng. *poor ovarian response*)

TMC – ukupan broj pokretljivih spermija (eng. *total motile sperm count*)

1. UVOD

In vitro oplodnja (IVF) i intracitoplazmatska injekcija spermija (ICSI) su prihvaćene kao učinkoviti načini liječenja neplodnosti. U načelu, da bi IVF bio uspješan potrebna je adekvatna folikularna regrutacija i maturacija (1).

Slab ovarijski odgovor (eng. *poor ovarian response*) se definira kao nemogućnost razvijanja dovoljnog broja zrelih folikula koji bi bili pogodni za aspiraciju jajnih stanica odnosno razvitak malog broja jajnih stanica nakon stimulacije gonadotropinima. Kod pacijentica koje se podvrgavaju IVF-u isti se pojavljuje u 9-24% žena (2).

1.1 MENSTRUACIJSKI CIKLUS

U ženskom reproduktivnom ciklusu nakon ovulacije slijedi menstrualno krvarenje prema točnom i predvidivom rasporedu. Taj ciklus se uspostavlja tijekom puberteta i ponavlja se pravilno sve do nekoliko godina pred menopauzu. Pravilni ovulatorni ciklusi se obično uspostave do treće godine nakon menarhe (prva menstruacija) i traju do perimenopauze, tako da žena od 15. do 45. godine ima 30 godina ovulatornih ciklusa odnosno 30 reproduktivnih godina (3).

Prosječno trajanje pojedinog ciklusa kod odraslih žena je 28 dana, računajući da je prvi dan menstruacijskog krvarenja ujedno i prvi dan ciklusa. Tri su faze menstruacijskog ciklusa. Prva je folikularna faza koja počinje menstruacijom i završava na dan skoka LH. Nakon 30 do 36 sati nastupa ovulacija. Treća faza je lutealna faza koja završava početkom iduće menstruacije. U prosječnom ciklusu i lutealna i folikularna faza traju 14 dana, no kako postoje varijacije u duljini trajanja ciklusa, tako može postojati i varijacija u duljini trajanja folikularne faze. Lutealna faza je konstantna i traje 14 dana (3).

1.1.1. OSOVINA HIPOTALAMUS – HIPOFIZA - JAJNIK

Interakcijom hipotalamusa, hipofize i jajnika, odnosno hormona koje izlučuju ta tkiva, dolazi do regulacije menstrualnog ciklusa. Stimulacijom i inhibicijom ovi hormoni direktno i indirektno potiču razvoj jajne stanice i ovulaciju, razvoj endometrija koji je spreman za implantaciju zametka te menstruaciju. Prekid ili poremećaj komunikacije ovih tkiva dovodi do poremećaja samog ciklusa, odnosno ovulacije i menstruacije, a posljedično i do poremećaja reprodukcije (3, 4).

Normalan menstruacijski ciklus, kao i reproduksijske funkcije, ovise o trajnom pulsatilnom oslobađanju hormona koji oslobađa gonadotropine (GnRH) iz neurona smještenih u *nucleus arcuatus* u hipotalamusu. Takva sekrecija GnRH stimulira i modulira oslobađanje gonadotropina iz hipofize. Različiti neurotransmiteri i kateholamini te intrinzična pulsatilnost GnRH neurona stimuliraju njegovo koordinirano otpuštanje (3, 4).

Pituitarni gonadotropini, folikul stimulirajući hormon (FSH) i luteinizirajući hormon (LH), su glikoproteini koje secernira prednji režanj hipofize. Oni se, također, izlučuju pulsatilno kao odgovor na lučenje GnRH, a osim toga izlučivanje im ovisi i o razini ovarijskih steroidnih hormona, estrogena i progesterona, te o ostalim ovarijskim faktorima (inhibin, aktivin i folistatin). U folikularnoj fazi ciklusa kada postoji relativni manjak estrogena dominantni gonadotropin koji se izlučuje je FSH. Jajnik na povišenje koncentracije FSH odgovara proizvodnjom estradiola, što kao posljedicu ima negativnu povratnu spregu na lučenje FSH, a pozitivnu povratnu spregu na lučenje LH (3, 4).

Sredinom ciklusa dolazi do skoka u sekreciji LH, što djeluje kao okidač za ovulaciju. Ovulacijom se ovarijski folikul pretvara u žuto tijelo (lat. *corpus luteum*) te započinje izlučivanje progesterona.

Pri rođenju ljudski jajnik sadrži oko milijun primordijalnih folikula. Svaki folikul sadrži oocitu zaustavljenu u profazi prve mejotičke diobe. Veliki broj ovih folikula propada, tako da u razdoblju oko menarhe preostaje samo 300 do 500 tisuća folikula (3, 4, 5).

Nezrela jajna stanica je okružena jednim slojem granuloza stanica. Rane faze sazrijevanja folikula se odvijaju neovisno o gonadotropinima (3, 5). Kada folikul u razvoju dosegne preantralnu fazu, daljnja progresija do antralne i preovulatorne faze je u potpunosti ovisna o gonadotropinima. Porast koncentracije FSH u ranoj folikularnoj fazi ciklusa dovodi do stvaranja kohorte, male skupine preantralnih folikula koji se razvijaju sinkrono. Samo će jedan, vodeći, folikul dosegnuti signifikantnu aktivnost aromataze unutar granuloza stanica, što će dovesti do povećane proizvodnje estradiola iz njegovog androgenog prekursora i, posljedično, do povećane sekrecije (5).

Kasnije u ciklusu granuloza stanice proliferiraju u nekoliko slojeva, a okolne stanice strome jajnika se diferenciraju u teka stanice. Granuloza stanice proizvode estrogene, uključujući estron i estradiol. Tek stanice proizvode androgene koji služe kao prekursori za proizvodnju estrogena u granuloza stanicama. Tijekom razvoja folikula FSH se veže na receptore na granuloza stanicama, što dovodi do proliferacije i njegovog povećanog vezanja.

To kao posljedicu ima povećanu proizvodnju estradiola. Estradiol stimulira proliferaciju LH receptora na teka i granuloza stanicama, a LH stimulira teka stanice da proizvode androgene. Povećana proizvodnja androgena dovodi do povećane proizvodnje estradiola. Estradiol djeluje negativnom povratnom spregom te suprimira sekreciju LH i FSH. U kasnoj folikularnoj fazi visoka koncentracija estradiola iz dominantnog folikula djeluje pozitivnom povratnom spregom na hipofizu, što dovodi do skoka LH koji je potreban za ovulaciju (3).

1.2. NEPLODNOST

Primarni sterilitet se opisuje kao stanje u kojem, u reprodukcijском razdoblju para, uz redovite i nezaštićene odnose tijekom godinu dana ne dolazi do trudnoće. Sekundarni sterilitet označava nemogućnost postizanja trudnoće nakon barem jedne prethodne trudnoće. Subfertilitet, odnosno umanjena plodnost jest stanje u kojem trudnoća može nastupiti, ali obično nakon dužeg razdoblja nego što je to slučaj kod normalno plodnog para. Kod mladih zdravih parova vjerojatnost zanošenja po ciklusu (fekundabilnost) iznosi oko 20% (6, 7). Prema podacima iz populacijskih studija, 10-15% parova u razvijenim zemljama je neplodno (8).

Da bi došlo do začeća potrebni su prethodeći događaji (7):

- Ovulacija zrele jajne stanice
- Produkcija spermija sposobnih za oplodnju
- Jukstapozicija spermija i jajne stanice u reproduktivnom traktu te oplodnja
- Stvaranje embrija sposobnog za život
- Transport embrija u maternicu
- Uspješna implantacija embrija u endometrij

Bilo kakav poremećaj navedenih koraka dovodi do neplodnosti ili umanjene plodnosti.

1.2.1. ETIOLOGIJA NEPLODNOSTI

Razlozi neplodnosti po Šimunić V. (6):

- Neodgovarajuća proizvodnja i/ili transport sjemena muškarca (40%)
- Neodgovarajuća proizvodnja jajne stanice u žene (25%)
- Smetnja susretu gameta (oplodnji) te transportu i implantaciji zigote (25%)

- Nerazjašnjena neplodnost (10%)

Broj parova u svakoj od ovih skupina varira ovisno o populaciji koja se promatra te o tome radi li se o primarnom ili sekundarnom sterilitetu (8). Općenito govoreći, na vjerojatnost zanošenja jako utječe učestalost i tempiranje spolnih odnosa, dob žene, laktacija, upalne bolesti zdjelice, prehrana i tjelovježba, pretilost, oralni kontraceptivi i neki drugi lijekovi, neki prenatalni faktori te stil života (pušenje, pijenje alkohola i kave) (9). Kod neplodnih žena, prethodna trudnoća, kraće trajanje neplodnosti i dob ispod 30 godina povećavaju šanse za zanošenje. S druge strane, tubarne bolesti, muška neplodnost i endometrioza istu smanjuju (8).

1.2.2. DIJAGNOZA NEPLODNOSTI

Obrada neplodnog para započinje u ginekološkoj ambulanti. Važno je naglasiti da, iako postoje neplodni parovi sa samo jednim uzrokom neplodnosti, nekoliko različitih uzroka može pridonositi neplodnosti u jednog para što je prilikom dijagnostike važno uzeti u obzir (5, 7). Kao kod nekih drugih stanja i ovdje se pokazuje važnost anamneze iz koje se može saznati sve o različitim stanjima i bolestima para koji se obrađuje. To može biti od velike pomoći u dijagnostici i liječenju.

1.2.2.1. UZROCI ŽENSKE NEPLODNOSTI

Izostanak ovulacije (anovulacija) ili rijetka ovulacija (oligoovulacija) su uzrok neplodnosti kod petine žena (4). Poremećaji ovulacije se dijagnostički mogu klasificirati kao hipogonadotropni hipogonadizam, normogonadotropna anovulatornost i hiperprolaktinemija u kojih se uspješno može inducirati ovulacija te hipergonadotropni hipogonadizam u kojem indukcija ovulacije nema smisla. Ostali uzroci ovulacijske disfunkcije mogu biti: genetski uzroci, autoimuni uzroci, kemo/radioterapija, bolesti štitnjače, bolesti nadbubrežne žlijezde, hiperandrogenemija, gubitak tjelesne mase, pretjerana tjelovježba, lijekovi (6). Uredne menstruacije te pravilni ciklusi ukazuju na postojanje ovulacije. Osim toga, mnoge žene imaju simptome karakteristične za ovulaciju i produkciju progesterona: osjećaj jednostrane nelagode u zdjelici, osjetljivost grudiju, smanjenje vaginalne sekrecije, osjećaj napuhnutosti trbuha, maleno povećanje tjelesne težine te povremene epizode depresije. Ove promjene se rijetko javljaju kod žena s anovulatornim ciklusima, stoga, ako se pojavljuju, može se pretpostaviti

da ovulacija postoji. Indirektni dokaz ovulacije se može dobiti mjerenjem bazalne temperature ili mjerenjem LH u urinu. Bazalna temperatura se mjeri svako jutro, odmah nakon buđenja. Dan nakon ovulacije temperatura poraste za 0,6°C. Ako se mjeri LH u urinu, do ovulacije dolazi 24 sata nakon skoka LH (7). Najsigurniji dijagnostički dokazi sposobnosti ovulacije su dinamičko praćenje folikulogeneze ultrazvukom, određivanje periovarijske serumske koncentracije estradiola i LH te progesterona sredinom luteinske faze ciklusa (6). Liječenje uzorka ovulatorne disfunkcije može dovesti do ovulacije i do izlječenja neplodnosti (7).

Abnormalnosti maternice, jajovoda te peritoneuma mogu uzrokovati neplodnost (7). Neki od uzroka mogu biti: upalna bolest zdjelice, endometrioza, prethodna izvanmaternična trudnoća, peritubarne i priovarijske priraslice, miomi, kongenitalne malformacija, intrauterine adhezije. Dijagnostički pristup otkrivanju smetnji za susret gameta te transport i implantaciju zametka sastoji se od ispitivanja strukturalnog i funkcionalnog stanja puta oplodnje. Cilj dijagnostičkih postupaka je uvid u kakvoću i prohodnost puta od ulaza u rodnicu do abdominalnog ušća jajovoda. Također je bitno razmotriti tuboovarijski odnos te posebno promotriti prohodnost i funkciju jajovoda. Za postizanje toga koristi se histerosalpingografija (HSG), laparoskopija (LSC), histeroskopija te tuboskopija i faloposkopija (6).

Tablica 1. Uzroci ženske neplodnosti.

UZROCI ŽENSKE NEPLODNOSTI – OVULACIJSKA DISFUNKCIJA	
Genetski	Bolesti nadbubrežne žlijezde
Autoimuni	Hiperandrogenemija
Kemo/radioterapija	Gubitak tjelesne težine
Bolesti hipofize	Pretjerana tjelovježba
Bolesti štitnjače	Lijekovi, narkotici
TUBARNI/PERITONEALNI UZROCI	
Upalna bolest zdjelice (PID)	Prethodna/e izvanmaternične trudnoća/e
Endometrioza	Peritubarne i periovarijske priraslice
CERVIKALNI FAKTOR	
Neodgovarajuća sluz	Cervicitis
Antispermalna antitijela	
UTERINI FAKTOR	
Miomi	Kongenitalne malformacije
Intrauterine adhezije	

1.2.2.2. UZROCI MUŠKE NEPLODNOSTI

Muška neplodnost je česta (20-40% svih uzroka neplodnosti) pa je zbog toga važno u dijagnostici neplodnog para napraviti i analizu ejakulata. Standardna analiza ejakulata procjenjuje kvalitetu i kvantitetu sjemene tekućine, koncentraciju spermija, pokretljivost i morfologiju. Ako su rezultati abnormalni, testiranje se ponavlja za jedan do dva tjedna. Osim analize ejakulata, potrebno je iz anamneze saznati postoje li neka prijašnja oboljenja koja bi mogla uzrokovati neplodnost (varikokela, spolne abnormalnosti), napraviti fizikalni pregled te provesti endokrinološka i genetička testiranja (6, 7). U timu za dijagnostiku i liječenje neplodnosti ocjenom fertilnosti muškarca se bavi androlog (6).

Uzroci muške neplodnosti mogu biti: testikularni (oštećena spermatogeneza), posttestikularni (oštećeni provodni kanali), predtestikularni (hipotalamičko-hipofizni poremećaji), infekcije mokraćnog i spolnog sustava te imunološki uzroci (6).

1.3. MEDICINSKI POMOGNUTA OPLODNJA

Pomognuta oplodnja koristi metode kojima se, osim oplodnje jajne stanice, pomaže i transport gameta, implantacija te razvitak trudnoće. Temelj uspješnosti tih metoda je pravilno i kontrolirano sazrijevanje jedne ili više jajnih stanica te kvaliteta postupaka u biološkom laboratoriju (10). U posljednjih 40 godina došlo je do drastičnog poboljšanja liječenja kako ženskih, tako i muških uzroka neplodnosti. Sada postoji cijeli niz tehnika s različitim akronimima kao što su: IVF, ICSI i drugi. S ovim naprecima moguće je uspješno liječiti većinu subfertilnih muškaraca i žena te im omogućiti postizanje željene trudnoće (8). Neplodni parovi obično započinju liječenje postepeno, tako da se prvo koriste neke konzervativnije tehnike, zatim napreduju na agresivniju ovarijsku stimulaciju, inseminaciju te IVF (7).

1.3.1. METODE MEDICINSKI POMOGNUTE OPLODNJE

Podjela metoda prema Šimunić V. (10):

- Intrauterina inseminacija (eng. *intauterineinsemination* – IUI)
- Intratubarna inseminacija (eng. *intratubalinsemination* – ITI)
- Izvantjelesna oplodnja – *in vitro* fertilizacija (IVF) i prijenos zametaka (eng. *embryo transfer* – ET)

- Unašanje gameta u jajovode (eng. *gamete intrafallopian transfer – GIFT*)
- Prenosjenje zigote ili embrija u jajovod (eng. *zygote intrafallopian transfer – ZIFT, tubal embryo transfer – TET*)
- Smrzavanje zametaka (krioprezervacija)
- Mikroinjekcija spermija u jajnu stanicu – intracitoplazmatska injekcija spremija (eng. *intracytoplasmic sperm injection – ICSI*)
- Preimplantacijska citogenetska biopsija zametaka

1.3.2. INDIKACIJE ZA MEDICINSKI POTPOMOĞNUTU OPLOĐNJU

IVF je metoda u kojoj se jajne stanice, dobivene kirurškim putem, u laboratoriju oplođuju spermijima (7). Originalna indikacija za IVF, bolest jajovoda, je još uvijek važna medicinska indikacija, ali, ako se uzme u obzir broj liječenih pacijentica, druge indikacije su postale važnije. Tijekom godina postignut je konsenzus o tome koje su primarne indikacije (11).

IVF indikacije prema Macklonu, Broekmansu i Fauseru (11):

- Patologija jajovoda
 - Ako se operacija jajovoda ne može napraviti, IVF je metoda izbora
 - U slučaju oslabljene funkcije jajovoda, ali bez okluzije ili nakon operacije jajovoda, IVF je metoda izbora ako neplodnost traje dulje od 2 godine
- Nerazjašnjena neplodnost (idiopatska)
 - IVF je indiciran ako neplodnost traje dulje od 3 godine ili kraće ako je žena starija od 36 godina
- Muška neplodnost
 - Ukupan broj pokretljivih spermija (TMC) < 1 milijun, ICSI je prvi izbor
 - TMC > 1 i < 10 milijuna, može se probati IVF ako neplodnost traje 2 ili više godina
 - TMC > 10 milijuna, liječi se kao idiopatska neplodnost
- Endometrioza
 - Slučajevi blage endometrioze liječe se kao idiopatska neplodnost
 - Teški slučajevi endometrioze se tretiraju kao da se radi o patologiji jajovoda
- Cervikalni faktor/ imunološka neplodnost
 - Ako neplodnost traje dulje od 2 godine, indiciran je IVF

- Hormonski poremećaji
 - Anovulacijski ciklusi su indikacija za IVF

1.3.3. SLAB OVARIJSKI ODGOVOR

Jedan od najistaknutijih faktora koji određuju ishod IVF-a je individualna raznolikost u odgovoru jajnika na stimulaciju. Pacijentice ne odgovaraju jednako na terapiju već se pojavljuju žene sa slabim (eng. *poor responders*, <4 jajne stanice dobivene aspiracijom) i žene s prevelikim odgovorom (eng. *hyper responders*, >15 jajnih stanica) jajnika na stimulaciju gonadotropinima. Prilagodbom stimulacijskog protokola, preveliki odgovor se može izbjeći, ali slab odgovor je jako rezistentan na terapiju (11, 12).

Za promatranje ovarijskog odgovora najbolje je koristiti stopu folikularnog rasta (eng. *follicular output rate*, FORT). FORT se izračunava iz omjera zbroja preovulacijskih folikula i zbroja malih antralnih folikula na početku stimulacije. Mali antralni folikuli su svi folikuli veličine 3 do 10 milimetara u promjeru. Pacijentice sa suboptimalnim i slabim ovarijskim odgovorom imaju nisku stopu folikularnog rasta. O niskoj stopi folikularnog rasta se može govoriti ako poraste do 30% folikula, a to se u 15% slučajeva događa i kod žena s dobrom rezervom jajnika (Poseidon grupe 1 i 2).

Mutacije u genima koji kodiraju LH, LH receptor i FSH receptor mogu biti uzrok slabog ovarijskog odgovora (eng. *poor ovarian response - POR*). Kod žena s tim mutacijama smanjena je osjetljivost jajnika na FSH. Najviše ispitivane su mutacije FSH receptora te je uočeno da se često radi o Ser680 genotipu, a takva mutacija dovodi do smanjene osjetljivosti FSH receptora za endogeni i egzogeni FSH. Ispitivanjem normogonadotropnih žena koje pokazuju smanjenu osjetljivost na FSH (npr. pacijentice koje su primile visoke doze FSH u prethodnim ciklusima MPO), a istovremeno imaju mutaciju LH, dokazano je da je dodavanje LH učinkovitije od povećavanja doze FSH za povećanje broja oocita. Kod pacijentica u kojih je dokazana mutacija FSH receptora dodavanje LH i FSH su učinkoviti u poboljšanju stope folikularnog rasta.

Unatoč kliničkom iskustvu u postupcima medicinski pomognute oplodnje, prognoza ovarijskog odgovora na stimulaciju je nepredvidljiva. Biološke osobine pacijentice imaju veći utjecaj od samog stimulacijskog protokola. Ostali parametri koji utječu na odgovor jajnika na hormonsku stimulaciju su distribucija izoformi FSH, prisutnost cirkulirajućih inhibitora te protutijela na FSH. Intraovarijska interferencija na razini vezivanja FSH za

receptor i prisutnost FSHR izoformi s promjenom prijenosa signala utječu na ovarijski odgovor na stimulaciju (13).

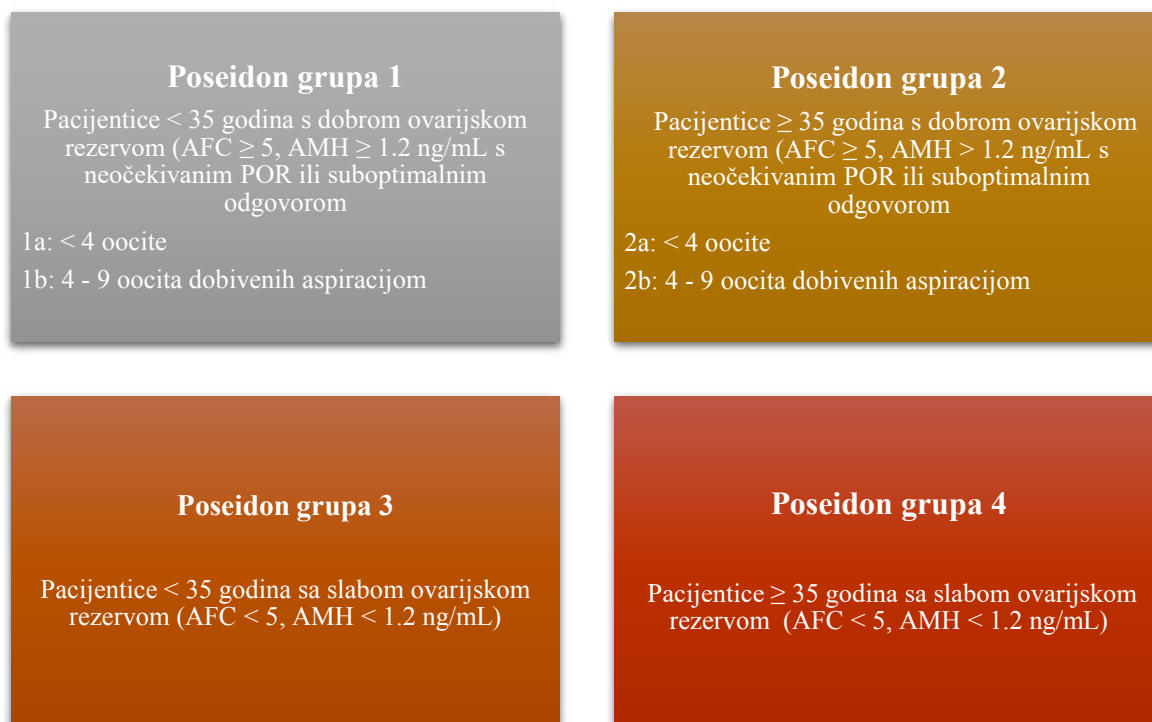
POR je također povezan s kronološkim starenjem. Uočena je korelacija više životne dobi sa smanjenim brojem i kvalitetom jajnih stanica te smanjenom stopom oplodnje. Liječenje pacijentica s POR-om je još uvijek kontroverzan i kompleksan klinički problem. POR na ovarijsku stimulaciju ukazuje na smanjeni folikularni odgovor, što rezultira manjim brojem dobivenih oocita (11, 14, 15).

U pokušaju standardizacije definicije POR-a, Ferraretti i sur. su predložili kriterije koji bi olakšali dijagnozu, a poznati su kao „Bolonjski kriteriji“. Da bi se definirao slab odgovor jajnika, moraju biti pozitivne barem dvije od tri navedene karakteristike: starija životna dob majke (>40 godina) ili neki drugi rizik za POR, prethodni POR ili abnormalni test ovarijske rezerve (nizak anti-Müllerov hormon - AMH ili broj antralnih folikula - AFC). Osim toga, da bi se pacijentica svrstala u kategoriju onih sa slabim odgovorom, dovoljno je da ima 2 ciklusa s POR-om, čak i ako su odsutni ostali navedeni kriteriji (15). Bolonjski kriteriji su se pokazali korisni u predviđanju ishoda IVF-a, ali njihova upotreba u kliničkim istraživanjima je upitna jer se u iste skupine stavljaju žene sa značajno različitim biološkim karakteristikama. Osim broja dobivenih jajnih stanica, postoje i druge varijable koje mogu utjecati na ishod liječenja: stopa aneuploidije embrija/blastociste koja raste s dobi te ovarijska osjetljivost na egzogene gonadotropine koja bi mogla biti povezana sa specifičnim genetskim profilom (14).

Poseidon grupa definira dvije kategorije oslabljenog odgovora jajnika na stimulaciju: suboptimalni odgovor (4-9 dobivenih jajnih stanica) i hipo-odgovor (viša doza gonadotropina i produljena stimulacija su potrebni da se dobije adekvatan broj oocita, više od 3). Osim toga, mijenjaju definiciju POR-a tako da je bazirana na kombinaciji heterogenih kriterija, a to je važno jer se postupci MPO rade na vrlo raznolikim fenotipovima i genotipovima pacijentica. Prilagođavanje postupaka MPO je stoga presudno za djelotvornost i sigurnost samih postupaka. Predloženo je drugačije grupiranje pacijentica s različitim prognozama te različitim strategijama stimulacije (14) (*Slika 1*):

1. Pacijentice mlađe od 35 godina s dostatnom prestimulacijskom rezervom jajnika ($AFC \geq 5$, $AMH \geq 1.2$ ng/mL) i s neočekivanim POR-om ili suboptimalnim odgovorom
2. Pacijentice starije od 35 godina s dostatnom prestimulacijskom rezervom jajnika ($AFC \geq 5$, $AMH \geq 1.2$ ng/mL) i s neočekivanim POR-om ili suboptimalnim odgovorom

3. Pacijentice mlađe od 35 godina sa slabim parametrima ovarijske rezerve ($AFC \leq 5$, $AMH \leq 1.2$ ng/mL)
4. Pacijentice starije od 35 godina sa slabim parametrima ovarijske rezerve ($AFC \leq 5$, $AMH \leq 1.2$ ng/mL)



Slika 1. Poseidon grupe.

Ovakva stratifikacija će pomoći individualiziranju protokola tako što će se otkriti polimorfizmi gonadotropina i njihovih receptora, koristiti različiti GnRH analozi te prilagoditi početna doza FSH i kasnije doze gonadotropina (14).

1.3.4. OVARIJSKA STIMULACIJA

Indukcija ovulacije je indicirana u pacijentica s anovulacijom ili oligoovulacijom. Prije početka ovarijske stimulacije treba razmotriti postojanje različitih stanja ili bolesti koje mogu dovesti do poremećaja ovulacije. Takva stanja uključuju: poremećaje rada štitnjače (hiper- te hipotireoza), hiperprolaktinemiju, sindrom policističnih jajnika (PCOS) te sva stanja s povišenom razinom stresa (psihološki stres, naporno vježbanje te poremećaji prehrane) (7).

Tri su temeljna pristupa pri indukciji ovulacije (10):

- Otklanjanje disfunkcija unutar reproduktivske osovine (hipotalamus–hipofiza–ovarij) lijekovima koji su proizvod pojedinih razina osovine ili koji potiču te razine na pojačan i usklađen rad. Mogu se postići jednostruke ili višestruke ovulacije.
- Otklanjanje disfunkcija izvan reproduktivske osovine (štitnjača, nadbubrežna žlijezda, gušterača), čime se postiže uredna funkcija inače zdrave osovine. Ovaj pristup dovodi do jednostruke ovulacije.
- Namjerna indukcija višestruke ovulacije (superovulacija, kontrolirana hiperstimulacija jajnika – COH) s ciljem ostvarivanja što veće mogućnosti zanošenja u jednome ciklusu.

U početku se za indukciju ovulacije najviše koristio klomifen citrat. Primjena mu je jednostavna, ima nisku stopu višeplođnih trudnoća (10%), malu vjerojatnost za hiperstimulaciju i razvitak cisti. Klomifen je selektivni modulator estrogenskih receptora (SERM), djeluje na razini hipotalamičkih estrogenskih receptora tako što umanjuje negativni povratni učinak endogenih estrogena na lučenje GnRH, a posljedično i gonadotropina pa se njihovo izlučivanje povećava. Preduvjet njegovog djelovanja je uredna reproduktivska osovina koja osigurava funkcionalnu koncentraciju endogenih estrogena (7, 16).

U zadnjih 20 godina protokoli MPO su znatno unaprijeđeni i sada se dijele u 3 velike kategorije (16):

1. Prirodni ciklus
2. Dugi protokol – agonistički ciklusi
3. Kratki protokol – antagonistički ciklusi

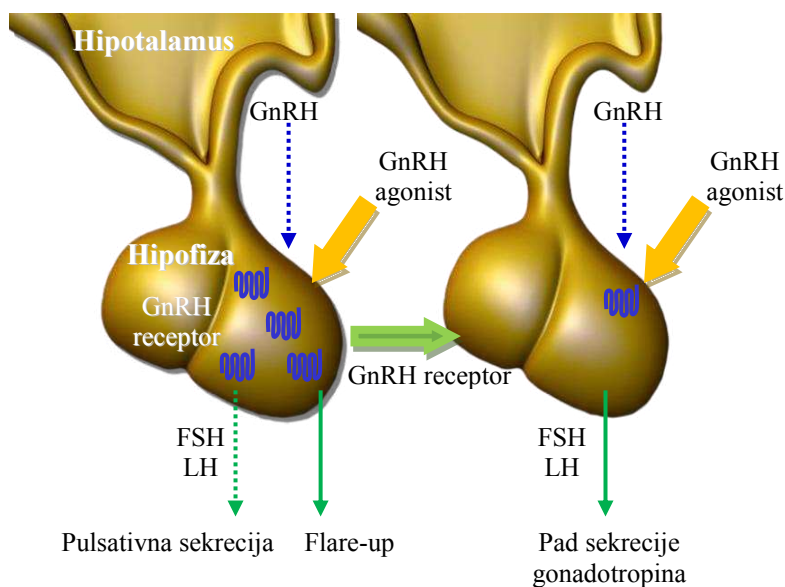
Postoje također i drugi kratki protokoli kao što je kratki agonistički protokol, ali on se u današnje vrijeme rijetko koristi zbog slabijeg uspjeha (16).

Danas se pacijenticama daju egzogeni gonadotropini da bi se stimulirao rast folikula. Upotreba gonadotropina se još naziva i kontrolirana ovarijska hiperstimulacija (COH). Cilj ovakve terapije je postići ovulaciju u žena s anovulacijskim ciklusima. Dostupni preparati sadrže purificirane humane gonadotropine (FSH i LH) te rekombinantni humani FSH. Doza ovih lijekova se prilagođava tjelesnoj masi žene, dobi, uzroku neplodnosti i odgovoru na prethodne tretmane. Ovi lijekovi su potentniji od klomifena i zahtijevaju česte preglede na kojima se prate rast folikula transvaginalnim ultrazvukom i koncentracija serumskog estradiola. Kad se prikaže barem jedan zreli folikul (promjer folikula 18 mm) i serumska koncentracija estradiola bude >200 pg/mL, daje se hCG da bi se potaknula ovulacija. Ovakva

terapija nosi sa sobom rizik ovarijskog hiperstimulacijskog sindroma (OHSS) koji može zahtijevati intenzivno liječenje te prekid stimulacije. Također, povećan je rizik multiplih gestacija (25%) te rizik za ektopične trudnoće (7).

1.3.4.1. AGONISTIČKI PROTOKOL

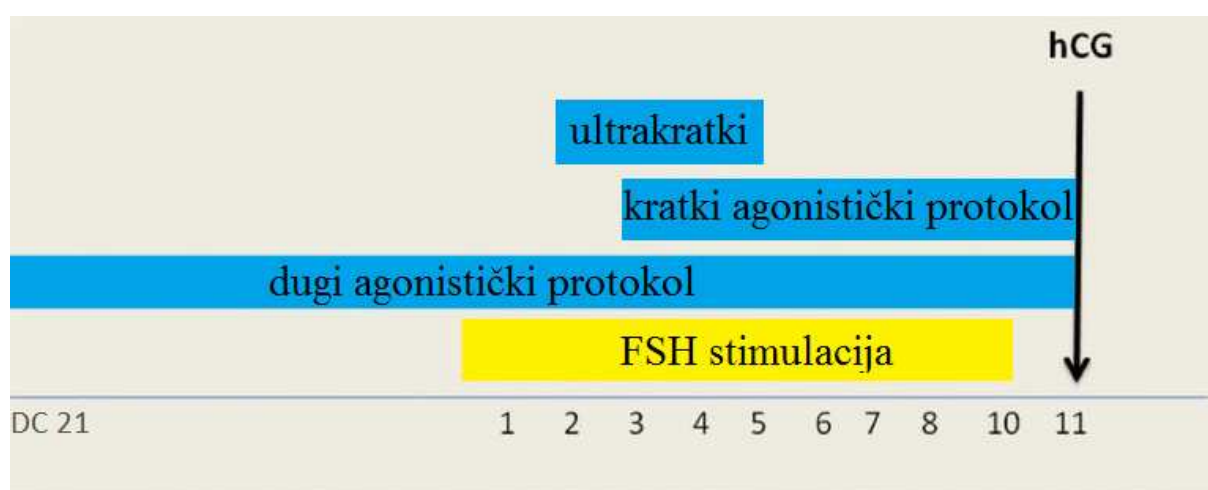
Dugi protokoli su zlatni standard za stimulaciju jajnika u mladih normo-gonadotropnih žena, no u pacijentica s POR agonisti GnRh mogu izazvati preveliku supresiju hipofize (1, 17). Oni uključuju davanje GnRH agonista na jedan od tri načina: u obliku nazalnog spreja (npr. buserelin, nafarelin) ili u obliku supkutane injekcije (buserelin, leuprorelin) svaki dan ili kao depo preparat (goserelin, leuprorelin). Agonist se daje kontinuirano i u početku povećava proizvodnju gonadotropina (eng. *flare effect*) (16). Ako se nastavi kontinuirano davanje agonista dolazi do tzv. prilagodbe naniže (eng. *downregulation*) receptora za GnRH. Taj tip prilagodbe zajednički je za hormonske receptore, a, kako je već navedeno, postaje izražen pri učincima izazvanim dugotrajnom primjenom lijeka (12, 18). Zbog prilagodbe receptora dolazi do pada koncentracije endogenih LH i FSH, supresije folikulogeneze i pada koncentracije estradiola na vrijednosti koje su normalne za menopauzu. Ti događaji omogućuju kasniji koordinirani rast folikula kao odgovor na egzogene gonadotropine (16, 17)(Slika 2.).



Slika 2. Djelovanje GnRH agonista na hipofizu.

Početak davanja agonista može biti ili 2. dan ciklusa ili, češće 21. dan. Razlog korištenja ovakvih, dugih, protokola je da bi se stvorila privremena menopauza u kojoj se

jajnici onda mogu stimulirati dnevnom uporabom injekcija FSH ili humanog menopauzalnog gonadotropina (hMG). Kod starta na 21. dan ciklusa (sredinom lutealne faze), pacijentica se pregleda 7-10 dana nakon početka davanja agonista (*Slika 3.*). Napravi se ultrazvuk te se izvadi serumska koncentracija estradiola da bi se osiguralo da je pacijentica adekvatno suprimirana. Ako je postignuta adekvatna suprimacija, započne se s davanjem gonadotropina (FSH, LH ili oba) idući dan i nastavlja se do postizanja odgovarajućeg ovarijskog odgovora. Kada je odgovor postignut, jednokratno se aplicira humani korionski gonadotropin (hCG). Rani folikularni start (2. dan ciklusa) se također može koristiti te pacijentica odlazi na kontrolu 2 tjedna nakon početka davanja agonista. Potom, ako je postignuta odgovarajuća supresija, započinje se s davanjem egzogenih gonadotropina (*Slika 3.*) (2, 16).

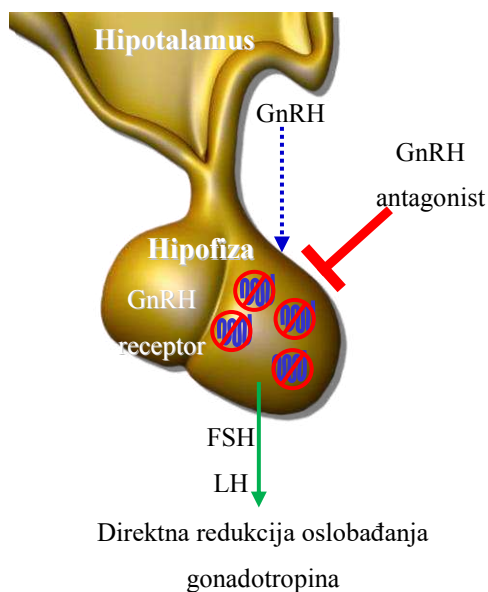


Slika 3. Protokoli s GnRH agonistima.

Nekoliko randomiziranih kliničkih studija je pokazalo da se kod IVF-ET, davanjem egzogenih gonadotropina u kombinaciji s agonistima GnRH da bi se postigla supresija lučenja pituitarnog FSH i LH, postiže viša stopa trudnoće u usporedbi s davanjem gonadotropina bez GnRH agonista. Neke od glavnih prednosti ovih lijekova su: smanjena stopa otkaza kroz prevenciju skoka LH i luteinizacije te poboljšanje regrutacije folikula, što dovodi do dobivanja većeg broja jajnih stanica (17).

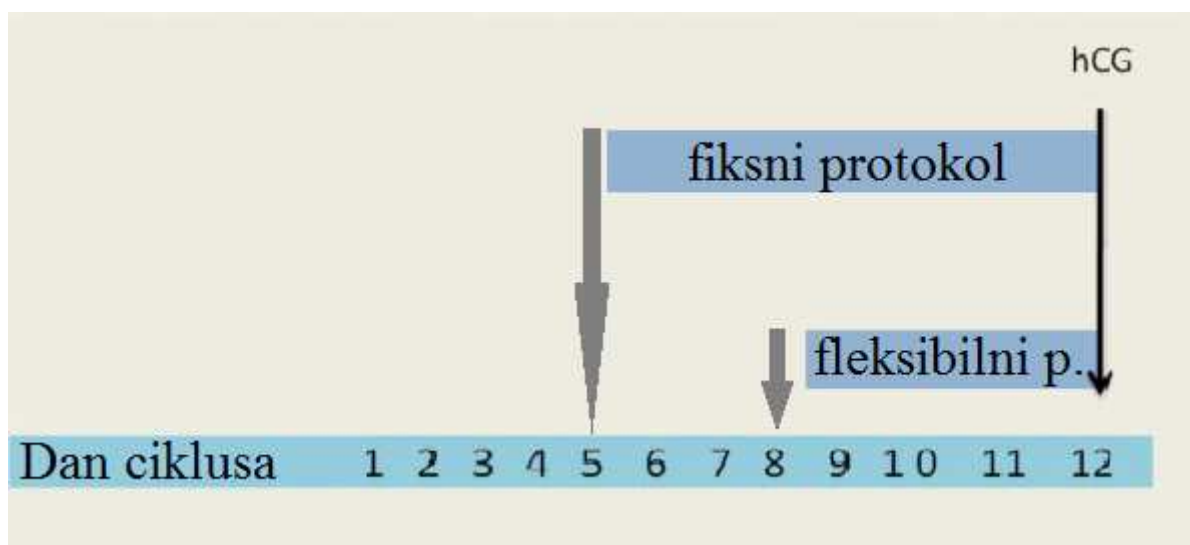
1.3.4.2. ANTAGONISTIČKI PROTOKOL

Antagonisti GnRH imaju gotovo trenutačan učinak na hipofizu i, za razliku od agonista, ne zahtijevaju nekoliko dana da bi dosegli menopauzalne razine gonadotropina (*Slika 4.*).



Slika 4. Djelovanje GnRH antagonista na hipofizu.

Daju se supkutano u obliku injekcije po jednoj od dvije sheme. Fiksni protokol započinje na 5. Dan ciklusa, dok se fleksibilni protokol započinje na dan kada je vodeći folikul veličine 14 milimetara (16,17) (*Slika 5.*).



Slika 5. Protokoli s GnRH antagonistima.

Cilj korištenja GnRH antagonista u IVF-u je inhibicija preranog skoka LH koji bi mogao dovesti do prerane luteinizacije, zaustavljanja sazrijevanja folikula te asinkronosti maturacije oocita. Upotreba GnRH antagonista ima i prednosti i mane (19).

Prednosti po Tarlatzis i sur. (19):

- Prevencija preranog LH skoka je lakša i zahtijeva manje vremena. GnRH antagonisti počinju djelovati za nekoliko sati i mogu se dati kada postoji rizik skoka LH. Za razliku od njih, GnRH agonisti djeluju tek nakon što nastupi prilagodba naniže nakon 7 do 10 dana.
- GnRH antagonisti nisu povezani s akutnom stimulacijom gonadotropina i steroidnih hormona koja se pojavljuje korištenjem GnRH agonista.
- Stimulacija GnRH agonistima može dovesti do stvaranja cisti, što se ne događa korištenjem antagonista.
- Nema valunga (eng. *hotflushes*) jer upotreba GnRH antagonista ne izaziva duboku hipoestrogenemiju kakva se pojavljuje uporabom agonista.
- Može se izbjeći slučajna upotreba GnRH analoga u ranoj trudnoći jer se GnRH antagonisti primjenjuju sredinom folikularne faze.
- Smanjena je potreba za egzogenim gonadotropinima, zbog čega je cijeli proces jeftiniji.
- Kraće je trajanje protokola u odnosu na agonističke protokole pa je pacijenticama ugodnije liječenje.

Nedostaci po Tarlatzis i sur. (19):

- Liječenje GnRH antagonistima je relativno nov pristup u ovarijskoj stimulaciji za IVF i potrebno je prikupiti još znanja o takvim protokolima.
- GnRH antagonisti nude manje fleksibilnosti u programiranju ciklusa ako se usporede s dugim agonističkim protokolima.
- Većina studija koje uspoređuju agonističke i antagonističke protokole prikazuju nešto nižu stopu ostvarenih trudnoća po ciklusu s GnRH antagonistima.

Osim ranije navedenih prednosti, bitno je naglasiti i to da je kod antagonističkih protokola znatno niža incidencija OHSS-a u usporedbi sa ženama na agonističkim protokolima jer ne postoji skok koncentracije gonadotropina u početku terapije. Kod antagonističkih protokola je moguće ovulaciju potaknuti GnRH agonistima umjesto hCG-om što osigurava adekvatnu

maturaciju oocita i dodatno smanjuje rizik OHSS-a. Zbog svega navedenog antagonistički protokoli se sve više prihvaćaju kao najprikladniji za ovarijsku stimulaciju (17).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1.HIPOTEZE

H1: Stopa implantacije kod pacijentica sa slabim odgovorom jajnika na prethodnu stimulaciju je veća kod onih stimuliranih antagonističkim protokolom u usporedbi s agonističkim.

H2: Poseidon grupe 1 i 2 imaju veću stopu implantacije od Poseidon grupa 3 i 4 bez obzira na vrstu protokola.

2.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj:

Glavni cilj ovog istraživanja je usporediti uspješnost protokola ovarijske stimulacije (antagonistički i agonistički protokoli) među pacijenticama sa slabim odgovorom jajnika na prethodne stimulacije i dobrom rezervom jajnika (Poseidon grupe 1 i 2) te pacijenticama sa slabim odgovorom jajnika na prethodne stimulacije i lošom rezervom jajnika (Poseidon grupe 3 i 4).

Primarne mjere ishoda:

- Razlika u stopi implantacije između antagonističkih i agonističkih protokola.
- Razlika u stopi implantacije (pozitivan HCG) između pacijentica sa slabim odgovorom jajnika na prethodne stimulacije i dobrom rezervom jajnika (Poseidon grupe 1 i 2) i pacijentica sa slabim odgovorom jajnika na prethodne stimulacije i lošom rezervom jajnika (Poseidon grupe 3 i 4).
- Razlika u stopi implantacije između antagonističkih i agonističkih protokola unutar svake skupine.

Sekundarne mjere ishoda:

- Usporedba broja jajnih stanica u MII fazi staničnog ciklusa između antagonističkih i agonističkih protokola unutar svake skupine te usporedba između skupina.
- Usporedba broja zametaka sa 6 i 8 stanica te u stadiju blastociste između antagonističkih i agonističkih protokola unutar svake skupine te usporedba između skupine 1 i skupine 2.

3. MATERIJAL I METODE

Ovo retrospektivno istraživanje provedeno je u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Split u razdoblju od 1. siječnja 2015. do 15. lipnja 2017. Podatci su prikupljeni iz povijesti bolesti pacijentica te iz baze podataka MPO Zavoda za humanu reprodukciju i endokrinologiju. U istraživanje je uključeno 46 pacijentica u dobi od 25 do 42 godine. Prikupljeni su podatci o trajanju steriliteta, vrsti protokola te gonadotropinima koji su korišteni u liječenju, jajnim stanicama dobivenim aspiracijom, zamecima te stopi implantacije.

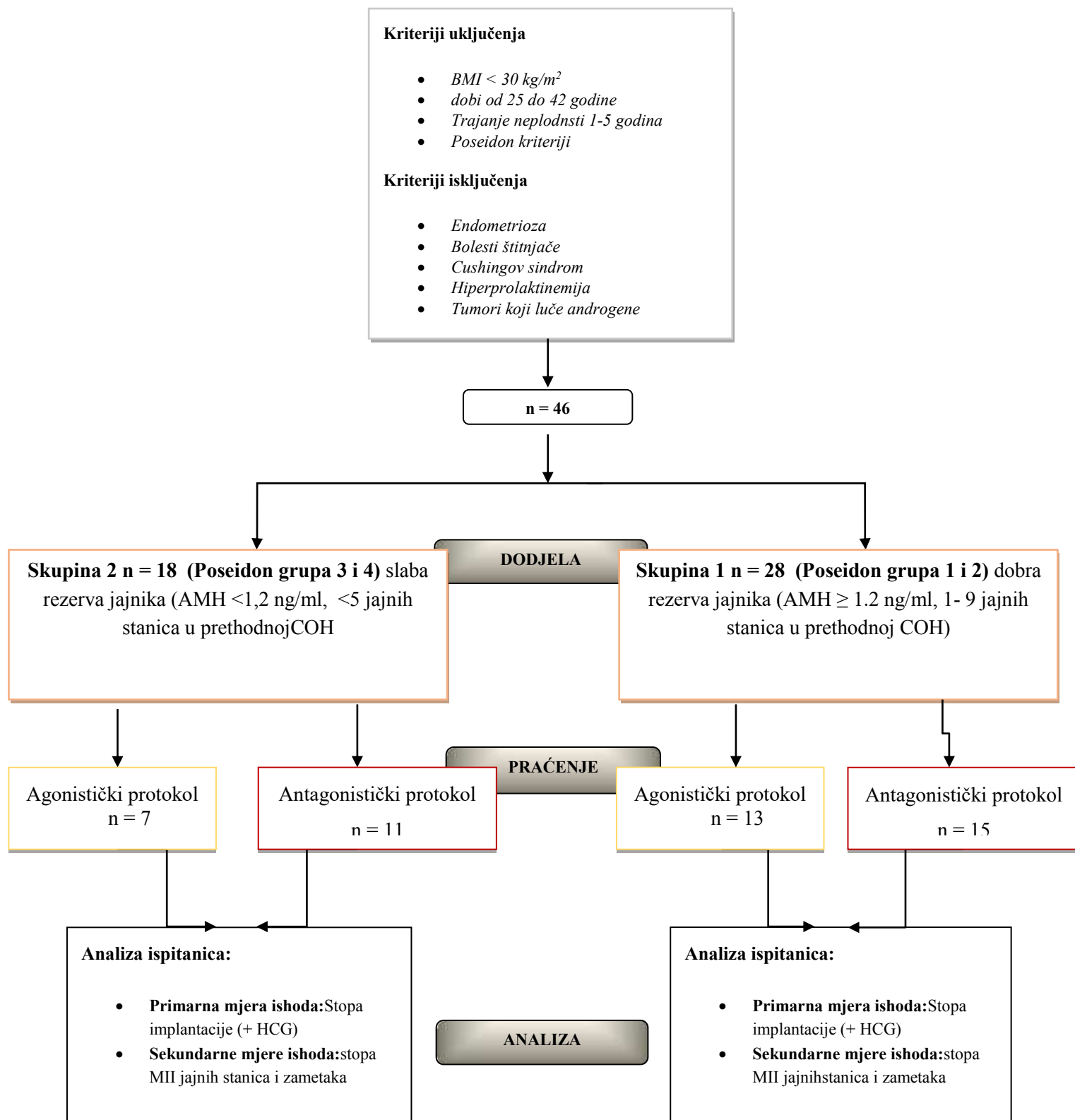
Ostali kriteriji uključivanja:

- BMI <30 kg/m²
- Trajanje neplodnosti 1-5 godina
- Poseidon kriteriji

Kriteriji isključivanja:

- Endometrioza
- Bolesti štitnjače
- Cushingov sindrom
- Hiperprolaktinemija
- Tumori koji luče androgene

Pacijentice su podijeljene u dvije skupine. Skupinu 1 sačinjavaju pacijentice koje odgovaraju Poseidon grupama 1 i 2, to su pacijentice s dobrom rezervom jajnika (AMH $\geq$ 1.2 ng/mL, 5-9 jajnih stanica u prethodnoj COH)(*Slika 6.*). U skupini 2 su pacijentice koje odgovaraju Poseidon skupinama 3 i 4, odnosno pacijentice sa slabom rezervom jajnika (AMH < 1.2 ng/mL, <5 jajnih stanica u prethodnoj COH)(*Slika 6.*).



*BMI-indeks tjelesne mase; AMH- anti-Müllerov hormon; COH-kontrolirana ovarijska hiperstimulacija; IU-internacionalne jedinice; HCG-humani korionski gonadotropin; MII-metafaза druge meјotske diobe;

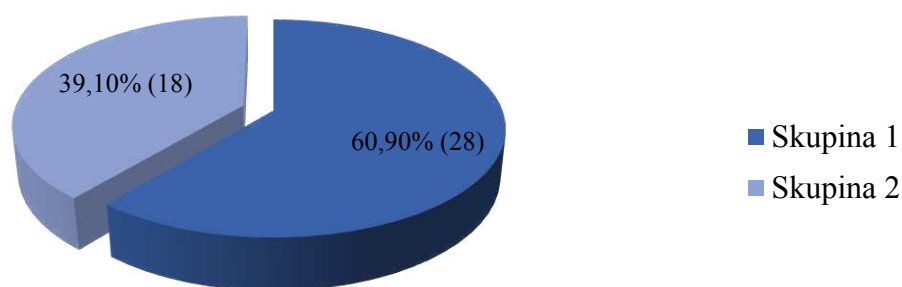
Slika 6. Dizajn studije (eng. *flow diagram*)

Prikupljeni podatci uneseni su u Word Excel te su obrađeni pomoću statističkog paketa IBM SPSS verzija 21.0.0 (IBM SPSS statistics software, New York, SAD). Svaki rezultat koji je imao $p < 0,05$ je smatran statistički značajnim.

4. REZULTATI

Ovo istraživanje je obuhvatilo 46 pacijentica koje su liječene analogima GnRH, a prethodno su loše odgovorile na COH. Raspoređene su u dvije skupine. Skupina 1 (Poseidon grupe 1 i 2) je obuhvatila 28 pacijentica (60,9%), a u skupinu 2 (Poseidon grupe 3 i 4) je svrstano njih 18 (39,1%).

Raspodjela pacijentica po skupinama



Slika 7. Raspodjela pacijentica po skupinama.

Tablica 2. Postotak pacijentica na agonističkim i antagonističkim protokolima

Protokol	Broj pacijentica
Agonistički	43,48%
Antagonistički	56,52%

U Tablici 2. se vidi postotak pacijentica na agonističkim i antagonističkim protokolima. Pacijentica na agonističkim protokolima ima 43,48%, a pacijentica na antagonističkim protokolima 56,52%.

Tablica 3. Broj pacijentica na antagonističkim i agonističkim protokolima unutar skupina.

Skupina	Protokol	Broj pacijentica
1	Agonistički	13
	Antagonistički	15
2	Agonistički	7
	Antagonistički	11

U Tablici 3. prikazano je koliki broj pacijentica unutar skupine 1 je bio na agonističkim protokolima (13) i na antagonističkim (15) te koliko pacijentica unutar skupine 2 je bilo na agonističkim (7), a koliko na antagonističkim protokolima (11).

Dob pacijentica

Prosječna dob pacijentica je 34,85 godina (prosječna dob u skupini 1 iznosi 34,32 godina, a u skupini 2 35,67 godina).

Tablica 4. Prosječna dob pacijentica

Skupina	Protokol	Prosječna dob (godine)
1	Agonistički	35,85
	Antagonistički	33,00
2	Agonistički	32,57
	Antagonistički	37,64

U Tablici 4. se vidi prosječna dob pacijentica razvrstanih po skupinama i po tipu protokola na kojem su bile. U skupini 1 pacijentice na agonističkim protokolima prosječno su imale 35,85 godina, a na antagonističkim 33,00 godina. U skupini 2 pacijentice na agonističkim protokolima prosječno su imale 32,57 godina, a na antagonističkim 37,64 godina.

Tablica 5. Broj pacijentica <35 godina i ≥35 godina

Skupina	Protokol	<35 godina	≥35 godina
1	Agonistički	14% (4)	32% (9)
	Antagonistički	43% (12)	11% (3)
2	Agonistički	28% (5)	11% (2)
	Antagonistički	6% (1)	55% (10)

U Tablici 5. su prikazani postoci pacijentica koje imaju <35 godina i ≥35 godina unutar svake skupine te razvrstani po protokolima. U skupini 1 pacijentica na agonističkom protokolu koje su imale <35 godina ima 14% (4), a ≥35 godina 32% (9). Kod onih na antagonističkom protokolu u skupini 1 <35 godina imalo je 43% (12) pacijentica, a ≥35 godina 11% (3) pacijentica. U skupini 2 pacijentica na agonističkom protokolu koje imaju <35 godina ima 28% (5), a onih koje imaju ≥35 godina 11% (2). Pacijentica u skupini 2 na

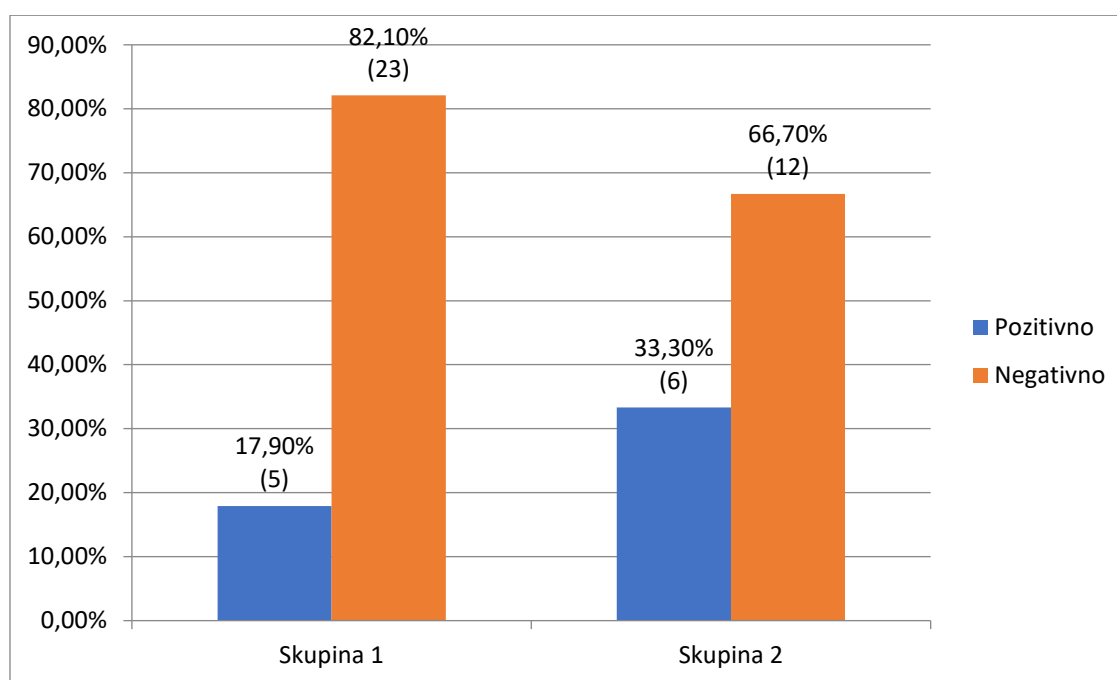
antagonističkim protokolima koje imaju <35 godina ima 6% (1), a onih koje imaju ≥35 godina 55% (10).

Stopa implantacije

Tablica 6. Prikaz usporedbe stopa implantacije između antagonističkih i agonističkih protokola.

Protokol	Pozitivno	Negativno
Agonistički	25%	75%
Antagonistički	23,08%	77%

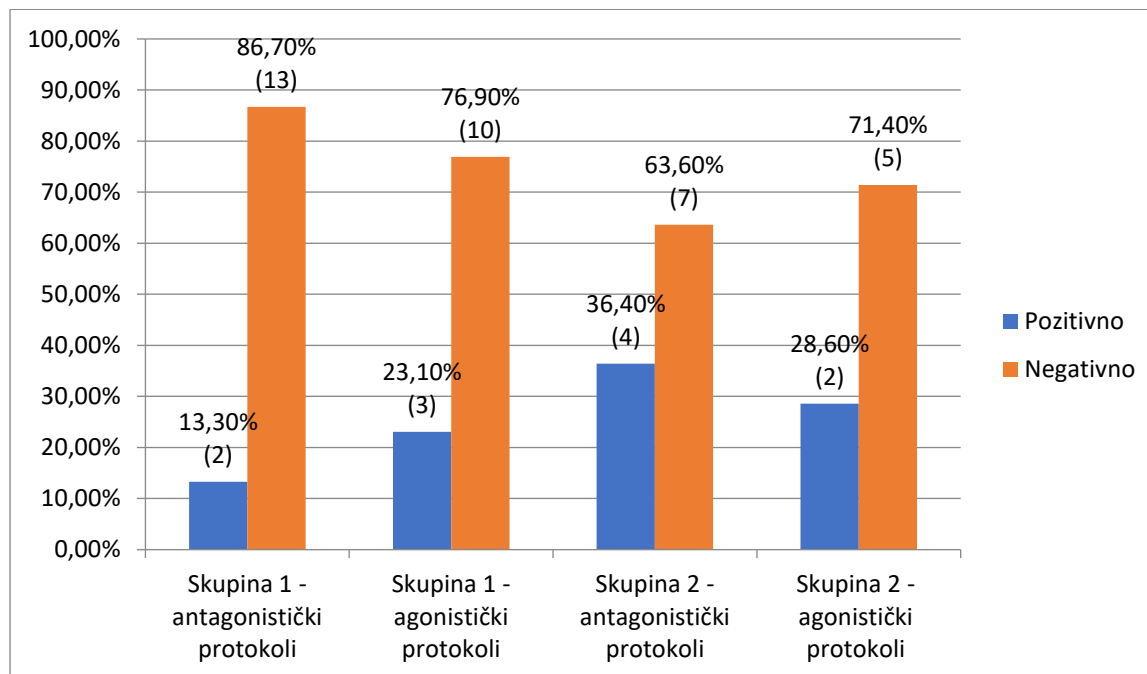
Tablica 6. prikazuje usporedbu stopa implantacije za agonističke i antagonističke protokole. Stopa implantacije je veća kod pacijentica na agonističkim protokolima (25%) u odnosu na one na antagonističkim protokolima (23,08%). Razlika u stopama implantacije je 1,9%, no ona nije statistički značajna ($p=0.88$).



Slika 8. Prikaz stopa implantacije za Skupinu 1 i skupinu 2.

Stopa implantacije vidljiva je na Slici 8.. Za svaku skupinu je zabilježeno koliko je bilo pozitivnih HCG testova odnosno koliko negativnih. Negativnim testovima dodijeljena je vrijednost 0, a pozitivnim 1 da bi se mogao provesti statistički t-test. U skupini 1 17,9% (5) slučajeva je pozitivno, a 82,1% (23) negativno. Skupina 2 ima 33,3% (6) pozitivnih slučajeva

i 66,7% (12) negativnih. Iako postoji razlike u stopama implantacije (15,4%) ona nije statistički značajna ($p=0,2$).



Slika 9. Usporedba stope implantacije između antagonističkih i agonističkih protokola unutar svake skupine .

Na Slici 9. prikazana je usporedba stope implantacije između antagonističkih i agonističkih protokola unutar svake skupine. Pacijentice na antagonističkim protokolima unutar skupine 1 imale su pozitivan HCG u 13,3% (2) slučajeva, a negativan HCG u 86,7% (13) slučajeva. Kod agonističkih protokola u skupini 1 pozitivnih HCG testova je bilo 23,1% (3), dok je negativnih bilo 76,9% (10). Razlika u stopama implantacije između agonističkih i antagonističkih protokola je 9,7%, no ona nije statistički značajna ($p=0,52$). Pacijentice na antagonističkim protokolima u skupini 2 imale su pozitivan HCG u 36,40% (4) slučajeva, a negativan HCG u 63,60% (7) slučajeva. Kod pacijentica na agonističkim protokolima u skupini 2 pozitivan HCG bio je u 28,6% (2) slučajeva, a negativan HCG bio je u 71,4% (5) slučajeva. Razlika stopa implantacije između agonističkih i antagonističkih protokola je 7,8%, no ona nije statistički značajna ($p=0,6$).

Broj stanica u MII fazi staničnog ciklusa

Tablica 7. Prosjek dobivenih jajnih stanica u MII fazi staničnog ciklusa.

Skupina	Broj pacijentica	Broj MII jajnih stanica (prosjek broja stanica po pacijentici)
1	23	4,39
2	16	3,75

Tablica 7. prikazuje koliki je prosječni broj stanica u MII fazi staničnog ciklusa dobiven unutar svake skupine. Obradeni su podatci 39 pacijentica jer se samo kod pacijentica koje su podvrgnute ICSI postupku MPO može vidjeti u kojoj su fazi staničnog ciklusa dobivene jajne stanice. U skupini 1 prosječan broj oocita u MII fazi staničnog ciklusa po pacijentici je 4,39, a u skupini 2 3,75. Razlika prosječnog broja zrelih oocita po pacijentici je 0,64, no razlika nije statistički značajna ($p=0,46$).

Tablica 8. Prosjek dobivenih jajnih stanica u MII fazi staničnog ciklusa po pacijentici, usporedba agonističkih i antagonističkih protokola unutar svake skupine.

Skupina	Protokol	Broj pacijentica	Broj MII jajnih stanica (prosjek broja stanica po pacijentici)
1	Agonistički	11	4,73
	Antagonistički	12	4,08
2	Agonistički	5	4,60
	Antagonistički	11	3,36

Tablica 8. prikazuje usporedbu prosječnog broja dobivenih jajnih stanica u MII fazi staničnog ciklusa kod agonističkih i antagonističkih protokola unutar svake skupine. U ovoj tablici su prikazani podatci 39 pacijentica, odnosno podatci pacijentica podvrgnutih ICSI postupku. U skupini 1 pacijentice koje su bile na agonističkim protokolima imaju prosječno 4,73 zrelih oocita, a one koje su bile na antagonističkim protokolima 4,08. Razlika je 0,65, no

ona nije statistički značajna ($p=0,52$). U skupini 2 pacijentice na agonističkim protokolima prosječno su imale 4,60 jajnih stanica u MII fazi staničnog ciklusa, a pacijentice na antagonističkim protokolima prosječno 3,36. Razlika je 1,24, no ona nije statistički značajna ($p=0,4$).

Zrelost zametaka

Tablica 9. Usporedba prosječnog broja zametaka sa 6 ili 8 stanica po pacijentici između skupine 1 i skupine 2.

Skupina	Broj pacijentica	Broj zametaka sa 6 ili 8 stanica (prosječan broj po pacijentici)
1	28	2,14
2	18	2,28

Tablica 9. prikazuje usporedbu prosječnog broja zametaka sa 6 ili 8 stanica po pacijentici između skupina. U skupini jedan prosječno je bilo 2,14 takvih zametaka po pacijentici, a u skupini 2 2,28. Razlika je 0,135, no ona nije statistički značajna ($p=0,8$).

Tablica 10. Usporedba prosječnog broja zametaka sa 6 ili 8 stanica po pacijentici između agonističkih i antagonističkih protokola unutar svake skupine.

Skupina	Protokol	Broj pacijentica	Broj zametaka sa 6 ili 8 stanica (prosječan broj po pacijentici)
1	Agonistički	13	2,54
	Antagonistički	15	1,80
2	Agonistički	7	3,00
	Antagonistički	11	1,82

U Tablici 10. prikazan je prosječan broj zametaka sa 6 ili 8 stanica za svaku pacijenticu. Prikazane vrijednosti su brojevi dobiveni na dan ET. Kako se ET može napraviti drugi, treći ili peti dan od aspiracije jajnih stanica, tako su zamecima sa 6 ili 8 stanica pribrojani oni koji su imali 4 stanice ako se radilo o ET na drugi dan. Pacijentice u skupini 1

na agonističkim protokolima prosječno su imale 2,54 zametaka sa 6 ili 8 stanica, a one na antagonističkim protokolima 1,80. Razlika je 0,74, no ona nije statistički značajna ($p=0,21$). U skupini 2 pacijentice na agonističkim protokolima prosječno su imale 3,00 zametaka sa 6 ili 8 stanica, a pacijentice na antagonističkim protokolima 1,82 takvih zametaka. Razlika je 1,18, no ona nije statistički značajna ($p=0,23$).

Rezultati ovog istraživanja prikazuju uspješnost dva različita protokola MPO kod pacijentica s lošim odgovorom jajnika na prethodne stimulacije.

Kao primarna mjera ishoda uzeta je stopa implantacije (pozitivan HCG). Uspoređivana je stopa implantacije između agonističkih i antagonističkih protokola. Od ukupnog broja pacijentica uključenih u istraživanje 43,48% (20) bilo je na agonističkim protokolima, a 56,52% (26) na antagonističkim protokolima. Iako je veći broj pacijentica bio na antagonističkim protokolima, višu stopu implantacije imale su pacijentice na agonističkim protokolima (25%). Razlika nije bila statistički značajna ($p=0,88$). U prospektivnoj randomiziranoj studiji Gordtsa i sur. (20) koja je uspoređivala uspješnost kratkog agonističkog i antagonističkog protokola pokazano je da su stope implantacije nešto više kod pacijentica na agonističkom protokolu (39%) u odnosu na one na antagonističkom protokolu (37%). Jedina razlika među pacijenticama koju su istraživači uočili bila je da su pacijentice na antagonističkom protokolu primile značajno veću dozu rekombinantnog FSH (rec-FSH) te su njihove razine serumskog estradiola bile značajno niže. U istraživanju nije navedena egzaktna p vrijednost, no navode da razlika nije značajna ($p>0,05$). Iako istraživači nisu naveli da je veća doza rec-FSH i niža koncentracija serumskog estradiola uzrok ovakvog rezultata, valja napomenuti da u istraživanju na pacijenticama KBC Split ne postoje podatci o dozama gonadotropina koje su pacijentice primile. Postoji mogućnost da i kod pacijentica liječenih u KBC Split postoji ovakva razlika, no u ovom istraživanju nisu praćene doze gonadotropina koje su pacijentice primile. To upućuje na daljnja istraživanja u smjeru eventualne povezanosti između te razlike i uspješnosti protokola. Meta analiza Pua i sur. (1) koja je uspoređivala uspješnost agonističkih i antagonističkih protokola kod žena s POR pokazala je također da ne postoji statistički značajna razlika u stopama implantacije između ova dva protokola.

Uspoređivana je i stopa implantacije između skupine 1 i skupine 2 te je dobiveno da je stopa implantacije viša u skupini 2 (33%) u odnosu na skupinu 1 (18%) pri čemu razlika nije statistički značajna ($p=0,2$). Također, provedena je usporedba stope implantacije u pacijentica na antagonističkim i agonističkim protokolima unutar svake skupine te je dobiveno da višu stopu implantacije u skupini 1 imaju pacijentice koje su bile na agonističkim protokolima (23%; $p=0,52$), dok su kod skupine 2 višu stopu implantacije imale pacijentice na antagonističkim protokolima (36%, $p=0,6$). Iako postoji razlika među stopama implantacije, ona nije statistički značajna. Nekoliko retrospektivnih i prospektivnih studija uspoređivale su stopu implantacije između agonističkih i antagonističkih protokola. Retrospektivna studija

D'Amata i sur. (21) pokazala je postizanje više stope implantacije kod antagonističkih protokola (13,5%) u odnosu na agonističke (7,6%), no razlika nije bila statistički značajna. Još je jedna retrospektivna studija Berin i sur. (22) pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u stopi implantacije između ova dva protokola. Prospektivna studija Merviel i sur. (23) pokazala je jednaku stopu implantacije za oba protokola. Istraživanje koje su proveli van Kooij i sur. (24) pokazalo je da najveći utjecaj na implantaciju embrija imaju dob žene te morfologija zametka, dok je novije istraživanje Terriou i sur. (25) pokazalo da je kvaliteta embrija, odnosno „*embryo score*“, najvažniji prediktor za trudnoću. Kako skupina 2 prosječno po pacijentici ima nešto više zrelih zametaka (2,28) u odnosu na skupinu 1 (2,14) moguće je da je zbog toga nastala razlika u stopama implantacije između skupine 1 i skupine 2. Važno je također naglasiti da u ovom istraživanju nisu praćeni ostali parametri koji ukazuju na kvalitetu zametaka (fragmentiranost i pravilnost stanica), a mogli bi po Terriou i sur. (25) pridonositi višoj stopi implantacije. Terriou i sur. (25) naglašavaju postojanje još nekih manje važnih prediktora kao što su dob žene, etiologija neplodnosti, ukupni broj dobivenih oocita, broj zrelih oocita, broj dobivenih zametaka koji bi mogli objasniti višu stopu implantacije u skupini 2. Lai i sur. (26) u svom istraživanju navode višu stopu implantacije za pacijentice na antagonističkim protokolima (15,82%) u odnosu na pacijentice na agonističkim protokolima (5,26%). Dokazali su da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) te da bi antagonistički protokoli mogli biti korisni za starije pacijentice koje su nekoliko puta bile na postupcima MPO i imale loš odgovor na stimulacije. U istraživanju na pacijenticama u KBC Split pacijentice na antagonističkim protokolima unutar skupine 2 imale su višu stopu implantacije, a prosječno imaju 37,64 godine (66% pacijentica ima ≥ 35 godina). Vjerojatno se radi o ženama koje zbog dobi imaju smanjenu ovarijsku rezervu te smanjen FORT. Pacijentice unutar skupine 1 imale su višu stopu implantacije ako su bile na agonističkim protokolima. Kako se u skupini 1 radi većinom o ženama mlađim od 35 godina (57% pacijentica ima < 35 godina) moguće je da imaju takav rezultat zbog mutacija LH, LH receptora ili FSH receptora. Budući da nije postojala mogućnost genetičkog testiranja ovih pacijentica, ne može se sa sigurnošću tvrditi da je to uzrok. Ako postoje takve mutacije, prilagodbom doze gonadotropina mogao bi se postići bolji odgovor.

U usporedbi prosječnog broja dobivenih jajnih stanica u MII fazi skupina 1 ih je imala 4,39, a skupina 2 3,75. Unutar skupine 1 pacijentice na antagonističkim protokolima prosječno su imale 4,08, a pacijentice na agonističkim protokolima 4,73 stanica u MII fazi staničnog ciklusa. U skupini 2 razlika u prosječnom broju jajnih stanica u MII fazi staničnog

ciklusa bila je nešto veća. Pacijentice na antagonističkim protokolima u skupini 2 imale su prosječno 3,36 takvih stanica, a pacijentice na agonističkim protokolima 4,60. Iako je u obje skupine ishod nešto bolji za pacijentice liječene agonističkim protokolima, razlika nije statistički značajna ($p=0,52$; $p=0,4$). D'Amato i sur. (21) pokazali su da više zrelih jajnih stanica imaju pacijentice na antagonističkim protokolima (4,29) u odnosu na one na agonističkim protokolima (2,65) te je ta razlika statistički značajna ($p<0,0001$). Još jedna je randomizirana kontrolirana studija (27) pokazala da pacijentice na antagonističkim protokolima imaju veći broj stanica u MII fazi staničnog ciklusa (5,32) u odnosu na one na agonističkim protokolima (5,00) no razlika nije bila statistički značajna.

Za procjenu kvalitete embrija važni su broj stanica, pravilnost i fragmentiranost stanica. U ovom istraživanju promatran je broj stanica pojedinog embrija te je dobrim embrijem smatran svaki koji ima 4 stanice ako se radilo o drugom danu ET, odnosno na treći i peti dan 6 i 8 stanica. Skupina 1 prosječno je imala 2,14 takvih embrija, a skupina 2 2,28. Usporedbom agonističkih i antagonističkih protokola unutar skupine 1 dobiveno je da pacijentice na agonističkom protokolu prosječno imaju 2,54 dobra embrija, a na antagonističkom protokolu 1,80. U skupini 2 pacijentice liječene agonistima GnRH prosječno su imale 3 dobra embrija, a one liječene antagonistima prosječno 1,82 dobrih embrija. D'Amato i sur. (21) pokazali su da pacijentice na antagonističkim protokolima prosječno imaju više embrija s „*embryo score*“ >1 .

Rezultati ove studije pokazuju da ni jedan od protokola ne poboljšava ishod za žene s POR jer razlika u dobivenim rezultatima po svim parametrima mjerenja nije statistički značajna. Razlog zbog kojeg se u mjerenjima ne pokazuje značajnost može biti neadekvatna veličina uzorka, što bi značilo da su potrebna daljnja istraživanja kako bi se mogli utvrditi nedvosmisleni rezultati istraživanja. Bitno je također naglasiti da su ishodi uspoređivani samo s obzirom na to o kojoj se vrsti protokola radilo, no nisu uzeti u obzir gonadotropini kojima su pacijentice stimulirane (Bemfola, Puregon, Pergoveris, Gonal F, Menopur, Elonva) te njihova doza.

6. ZAKLJUČCI

1. POR je indikator smanjene zalihe primordijalnih folikula te su jajne stanice dobivene iz tih folikula suboptimalne kvalitete.
2. Pokazano je da pacijentice s POR liječene agonističkim protokolima imaju nešto veći broj stanica u MII fazi staničnog ciklusa prosječno, no razlika nije statistički značajna ($p>0,05$).
3. Prosječni broj dobrih zametaka (6 i 8 stanica) je veći kod pacijentica liječenih agonistima GnRH u odnosu na antagoniste GnRH, no razlika nije statistički značajna ($p>0,05$).
4. Ovo istraživanje pokazalo je da ne postoji statistički značajna razlika u stopi implantacije (pozitivan HCG) između skupina 1 i 2 te između agonističkih i antagonističkih protokola unutar pojedinih skupina.
5. Može se zaključiti da dostupne terapijske metode pokazuju približno jednaku učinkovitost za žene s POR, a takav loš odgovor na terapiju nastaje vjerojatno zbog malog broja jajnih stanica u rezervi jajnika te zbog njihove smanjene kvalitete. Važno je napomenuti da loš odgovor na terapiju može nastati i zbog genetskih mutacija LH, LH receptora i FSH receptora.
6. Istraživanje na većem broju ispitanica bi moglo donijeti više spoznaja o tome koja je terapija optimalna za pacijentice s POR.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Pu D, Wu J, Liu J. Comparisons of GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol in poor ovarian responders undergoing IVF. *Human Reproduction*. 2011;26(10):2742-9.
2. Sunkara S, Coomarasamy A, Khalaf Y, Braude P. A three-arm randomised controlled trial comparing Gonadotrophin Releasing Hormone (GnRH) agonist long regimen versus GnRH agonist short regimen versus GnRH antagonist regimen in women with a history of poor ovarian response undergoing in vitro fertilisation (IVF) treatment: Poor responders intervention trial (PRINT). *Reproductive Health*. 2007;4(1).
3. Reproductive cycles. U: Beckmann C, Ling F, Barzansky B, Herbert W, Laube D, Smith R. *Obstetrics and gynecology*. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.str.303-8.
4. Šimunić V. Menstruacijski ciklus. U: Šimunić V, Ciglar S, Suchanek E, urednici. *Ginekologija*. Zagreb: Naklada ljevak; 2001.str.30-60.
5. Ledger W. The menstrual cycle. U: Edmonds K. *Dewhurst's Textbook of Obstetrics and Gynaecology*. Blackwell Publishing; 2007.str.348-55.
6. Ciglar S. Bračna neplodnost. U: Šimunić V, Ciglar S, Suchanek E, urednici. *Ginekologija*. Zagreb: Naklada ljevak; 2001.str.349-57.
7. Infertility. U: Beckmann C, Ling F, Barzansky B, Herbert W, Laube D, Smith R. *Obstetrics and gynecology*. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.str.337-46.
8. Bhattacharya S. Infertility. U: Edmonds K. *Dewhurst's Textbook of Obstetrics and Gynaecology*. Blackwell Publishing; 2007.str.440-60.
9. Baird DD, Strassmann BI. Women's Fecundability and Factors Affecting It. U: Goldman MB, Hatch MC. *Women and Health*. Academic Press, 2000.str.126-38.
10. Šimunić V. Izvantjelesna oplodnja i druge metode pomognute oplodnje u čovjeka. U: Šimunić V, Ciglar S, Suchanek E, urednici. *Ginekologija*. Zagreb: Naklada ljevak; 2001.str.357-67.
11. Macklon N., Broekmans F., Fauser B. Indications for IVF treatment: from diagnosis to prognosis. U: Gardner D. *Textbook of assisted reproductive technologies*. London: Informa Healthcare; 2009.str.447-58.
12. Haas J, Ophir L, Barzilay E, Yerushalmi i sur. GnRH Agonist vs. hCG for Triggering of Ovulation – Differential Effects on Gene Expression in Human Granulosa Cells. *PLoS ONE*. 2014;9(3): e90359.

13. Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85, 3365-9.
14. Alviggi C, Andersen C, Buehler K, Conforti A i sur. A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept. *Fertility and Sterility*. 2016;105(6):1452-3.
15. Ferraretti A, La Marca A, Fauser B, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Human Reproduction*. 2011;26(7):1616-24.
16. Trew G. Assisted reproduction. U: Edmonds K. *Dewhurst's Textbook of Obstetrics and Gynaecology*. Blackwell Publishing; 2007.str.461-78.
17. Depalo R, Jayakrishan K, Garruti G i sur. GnRH agonist versus GnRH antagonist in in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012;10(1):26.
18. Kako djeluju lijekovi: osnovni principi. U: Rang H, Dale M, Ritter J, Moore P. *Farmakologija*. Zagreb: Golden marketing-Tehnička knjiga; 2006.str.7-21.
19. Tarlatzis B, Fauser B, Kolibianakis E, Diedrich K, Devroey P. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Human Reproduction Update*. 2006;12(4):333-40.
20. Gordts S, Puttemans P, Campo R, Valkenburg M, Gordts S. A prospective randomised study comparing a GnRH-antagonist versus a GnRH-agonist short protocol for ovarian stimulation in patients referred for IVF. *Facts, Views and Vision in ObGyn*. 2012;4(2):82-7.
21. D'Amato G, Caroppo E, Pasquadibisceglie A, Carone D, Vitti A, Vizziello G. A novel protocol of ovulation induction with delayed gonadotropin-releasing hormone antagonist administration combined with high-dose recombinant follicle-stimulating hormone and clomiphene citrate for poor responders and women over 35 years. *Fertility and Sterility*. 2004;81(6):1572-7.
22. Berin I, Stein D, Keltz M. A comparison of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist and GnRH agonist flare protocols for poor responders undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 2010;93(2):360-3.
23. Merviel P, Cabry-Goubet R, Lourdel E i sur. Comparative prospective study of 2 ovarian stimulation protocols in poor responders: effect on implantation rate and ongoing pregnancy. *Reproductive Health*. 2015;12(1).

24. van Kooij R, Looman C, Habbema J, Dorland M, te Velde E. Age-dependent decrease in embryo implantation rate after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 1996;66(5):769-75.
25. Terriou P, Sapin C, Giorgetti C, Hans E, Spach J, Roulier R. Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *Fertility and Sterility*. 2001;75(3):525-31.
26. Lai Q, Zhang H, Zhu G. Comparison of the GnRH agonist and antagonist protocol on the same patients in assisted reproduction during controlled ovarian stimulation cycles. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2013;6(9):1903-10.
27. Cheung L, Lam P, Lok I i sur. GnRH antagonist versus long GnRH agonist protocol in poor responders undergoing IVF: a randomized controlled trial. *Human Reproduction*. 2005;20(3):616-21.

8. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA: Usporediti uspješnost protokola ovarijske stimulacije (antagonistički i agonistički protokoli) među pacijenticama sa slabim odgovorom jajnika na prethodne stimulacije i dobrom rezervom jajnika (skupina 1 – Poseidon grupe 1 i 2) te pacijenticama sa slabim odgovorom jajnika na prethodne stimulacije i lošom rezervom jajnika (skupina 2 – Poseidon grupe 3 i 4).

MATERIJALI I METODE: Ovo retrospektivno istraživanje provedeno je u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Split u razdoblju od 1. siječnja 2015. do 15. lipnja 2017. Podatci su prikupljeni iz povijesti bolesti pacijentica te iz baze podataka MPO Zavoda za humanu reprodukciju i endokrinologiju. U istraživanje je uključeno 46 pacijentica u dobi od 25 do 42 godine. Prikupljeni su podatci o trajanju steriliteta, vrsti protokola te gonadotropinima koji su korišteni u liječenju, jajnim stanicama dobivenim aspiracijom, zamecima te stopi implantacije. Kriteriji uključivanja bili su BMI $<30 \text{ kg/m}^2$, trajanje neplodnosti 1-5 godina i Poseidon kriteriji. Kriteriji isključivanja bili su endometrioza, bolesti štitnjače, Cushingov sindrom, hiperprolaktinemija i tumori koji luče androgene.

REZULTATI: Stopa implantacije za skupinu 1 bila je 17,9%, a za skupinu 2 33,3%. Unutar skupine 1 stopa implantacije za agonističke protokole bila je 23%, a za antagonističke protokole 13,3%. Za skupinu 2 stopa implantacije za agonističke protokole bila je 28,6%, dok je za antagonističke protokole bila 36,4%. Analizom podataka 39 pacijentica podvrgnutih ICSI postupku dobiveno je da u skupini 1 prosječno bilo 4,39 jajnih stanica u MII fazi staničnog ciklusa (zrele jajne stanice), dok ih je u skupini 2 bilo 3,75. Unutar skupine 1 pacijentice na agonističkim protokolima su prosječno imale 4,73 zrele jajne stanice, a pacijentice na antagonističkim protokolima 4,08. U skupini 2 pacijentice liječene agonistima GnRH su prosječno imale 4,60 zrelih jajnih stanica, a pacijentice liječene antagonistima GnRH 3,36.

ZAKLJUČCI: Nije pokazana veća uspješnost ni jednog od dva uspoređivana protokola MPO. Potrebno je što ranije započeti liječenje žena s lošom zalihom jajnika kako bi se postigao što bolji ishod. Protokoli s GnRH antagonistima imaju prednost nad agonističkim protokolima zbog jednostavnosti primjene, manje nuspojava te smanjene mogućnosti za nastanak OHSS-a.

9. SUMMARY

THESIS TITLE: A comparison of GnRH agonist and antagonist protocols in patients with poor ovarian response to prior stimulation

RESEARCH OBJECTIVE: To compare the successfulness of ovarian stimulation protocols (agonist and antagonist protocols) among patients with poor ovarian response to prior stimulation with a good ovarian reserve (group 1 – Poseidon groups 1 and 2) and patients with poor ovarian response to prior stimulation with a bad ovarian reserve (group 2 – Poseidon groups 3 and 4)

MATERIAL AND METHODS: This retrospective study took place at the Department of Gynecology and Obstetrics in KBC Split from 1. January 2015. to 15. June 2017. The data on the duration of infertility, the protocol type and gonadotropins used in treatment were collected from patients' medical histories and from an ART database at the Institute for Human Reproduction and Endocrinology. A total of 46 women, aged 25-42, were included in the study. The inclusion criteria were: BMI <30 kg/m², the duration of infertility 1-5 years and Poseidon criteria. The exclusion criteria were: endometriosis, thyroid disease, Cushong syndrome, hyperprolactinemia and androgen secreting tumors.

RESULTS: The implantation rate in group 1 was 17,9% and in group 2 33,3%. Group 1 agonist protocols had an implantation rate of 23 %, while group 1 antagonist protocols had an implantation rate of 13,3%. Group 2 agonist protocol implantation rate was 28,6% and group 2 antagonist protocol implantation rate was 36,4%. By analyzing the data of 39 patients that underwent the ICSI procedure it can be seen that group 1 had 4,39 MII (mature) oocytes on average and group 2 had 3,75. Group 1 patients on agonist protocols had 4,73 mature oocytes on average, while group 1 patients on antagonist protocols had 4,08. Group 2 patients treated with GnRH agonist had 4,60 mature oocytes on average and group 2 patients treated with GnRH antagonists had 3,36 mature oocytes on average.

CONCLUSION: The compared protocols show similar success rates. An early start with ART in women with POR remains the only choice for successful treatment. The GnRH antagonist protocols have an advantage over the GnRH agonist protocols due to their ease of use, less side effects and a decreased chance of OHSS.

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI:

IME I PREZIME: Marija Bušić

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 12. svibnja 1992. godine, Split, Republika Hrvatska

DRŽAVLJANSTVO: Hrvatsko

ADRESA STANOVANJA: Put Žnjana 17

E-MAIL: marija.busic@hotmail.com

OBRAZOVANJE:

1999.-2007. Osnovna škola Blatine-Škrape, Split

2007.-2011. Srednja škola: 3. gimnazija, Split

2011.-2017. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, smjer doktor medicine

ZNANJA I VJEŠTINE:

JEZICI:

Hrvatski jezik (materinski)

Engleski jezik (C2 razina)

Talijanski jezik (A1 razina)