

dr n. med. Anna Janicka¹

prof. dr hab. n. med. Rafał Kurzawa^{1,2}

¹Centrum Ginekologii i Leczenia Niepłodności VitroLive w Szczecinie

²Zakład Zdrowia Prokreacyjnego Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie



Wykorzystanie USG w ocenie stymulacji jajczkowania

WPROWADZENIE

Niepłodność jest chorobą, na którą cierpi co piąta para w Polsce. Ultrasonografia jest podstawowym niezbędnym narzędziem w diagnostyce niepłodności i monitorowaniu czynności jajników – pozwala na dokonanie właściwych decyzji zwiększających szansę na powodzenie procedury i minimalizację ryzyka zdarzeń niepożądanych. Monitorowanie jajczkowania z zastosowaniem USG należy prowadzić podczas indukcji, stymulacji i hiperstymulacji jajczkowania. Dominującą techniką w ocenie stymulacji jajczkowania jest klasyczna ultrasonografia 2D. Zaawansowane techniki USG (3D, PD) nie znalazły powszechnego zastosowania w niniejszym procesie.

ETIOLOGIA NIEPŁODNOŚCI

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) definiuje chorobę, jaką jest niepłodność, jako niemożność uzyskania lub donoszenia ciąży po roku regularnego współżycia bez stosowania metod antykoncepcyjnych. Niemożność zajścia w ciążę i urodzenia dziecka wiąże się ze stresem porównywanym z tym, który wywołuje śmierć bliskiej osoby czy choroba nowotworowa. W Polsce żyje około 9 mln kobiet w okresie rozrodczym. Częściowe ograniczenie płodności i bezwzględna niepłodność dotyczy około 20%, tj. około 1,5 mln par. Rocznie co najmniej 2% (24 000 par) wymaga zapłodnienia pozaustrojowego. Są to dane szar-

cunkowe, brakuje bowiem badań epidemiologicznych gruntownie oceniających skalę problemu w Polsce. Jak wynika z raportu European IVF Monitoring (EIM), rzeczywista liczba zabiegów z wykorzystaniem technik wspomaganego rozrodu (ART – assisted reproductive technology) wyniosła w Polsce w 2012 roku 17 116 cykli, w tym 10 714 stanowiły stymulacje do procedur zapłodnienia pozaustrojowego metodami IVF (klasyczne zapłodnienie pozaustrojowe) i ICSI (docytoplazmatyczne wstrzyknięcie plemnika do komórki jajowej).

Niepłodność jest chorobą dotyczącą obojga partnerów, a nie tylko kobiety czy mężczyzny. W około 40% przypadków odpowiada za nią czynnik żeński, w 35% męski. Często u jednej pary czynnik żeński i męski współistnieją ze sobą. Niestety, nadal dla około 20% niepłodnych par przyczyna bezdzietności pozostaje nieznana.

Do najczęstszych przyczyn niepłodności u kobiet należą zaburzenia jajczkowania oraz wrodzone i nabyte zaburzenia anatomiczne dotyczące jajowodów i/lub macicy. U mężczyzn dominują nieprawidłowe parametry nasienia, czego etiologia jest wieloczynnikowa. Proponowany schemat leczenia powinien być zgodny z rekomendacjami towarzystw naukowych i dostosowany do sytuacji klinicznej pary, przyczyny niepłodności, wieku kobiety i czasu starań o ciążę. Kluczowym elementem w procesie terapeutycznym jest uzyskanie komórki jajowej

zdolnej do zapłodnienia (w warunkach in vivo lub in vitro).

Ultrasonografia jest powszechnym nieinwazyjnym narzędziem w diagnostyce niepłodności i monitorowaniu czynności jajników. W sposób powtarzalny i bezpieczny pozwala na precyzyjne obrazowanie badanych struktur i ich ocenę w czasie rzeczywistym. Znajduje zastosowanie zarówno w ocenie narządu rodnej kobiety, jak i przebiegu jajczkowania. Stanowi niezbędny etap w procedurach wspomaganego rozrodu (inseminacji domacicznej oraz zapłodnienia pozaustrojowego).

ROLA USG W CYKLU NATURALNYM

Kluczowym narzędziem w ocenie jajczkowania jest prawidłowo zebrany wywiad dotyczący regularności krwawień miesięcznych. O zaburzeniach owulacji świadczy zaburzony rytm krwawień (miesiączki rzadkie – oligomenorrhea lub częste – polymenorrhea), ich brak (amenorrhea) oraz krwawienia czynnościowe.¹ Kobieta, która miesiączkuje regularnie (w odstępach od 21 do 35 dni) i/lub obserwuje dwufazowość cyklu, z bardzo dużym prawdopodobieństwem (97%) ma cykl miesięczkowy przebiegający z owulacją, czyli uwieńczony uwolnieniem dojrzałej komórki jajowej zdolnej do zapłodnienia.²

Na ocenę jajczkowania w cyklu naturalnym może się składać badanie USG w końcu fazy folikularnej wraz z jednorazowym pomiarem stężenia progesteronu na siedem dni przed spodziewaną miesiączką (tj. zwykle w 21 dniu cyklu). Stężenie progesteronu w surowicy krwi $>9,4$ ng/ml stanowi potwierdzenie procesu owulacji, stężenie <2 ng/ml wskazuje na jej brak.^{1,2} Wartość predykcyjna stężeń progesteronu w ocenie jajczkowania sięga 100%, gdy przekraczają one 10 ng/ml. Z tego powodu w Stanach Zjednoczonych ocena stężenia progesteronu jest jedynym rekomendowanym badaniem służącym ocenie owulacji u kobiet starających się o dziecko. Jest to wynik analizy ekonomicznej badań hormonalnych w stosunku do USG, które w tym kraju jest znacznie droższe.

O ile można znaleźć uzasadnienie dla pojedynczego badania USG połączonego z oceną anatomii narządu rodnej kobiety, o tyle nie ma konieczności wykonywania seryjnych badań USG w kolejnych dniach cyklu w fazie wzrostu pęcherzyków jajnikowych i po owulacji w celu wykluczenia lub określenia nieprawidłowości w jego przebiegu. W procesie diagnostycznym nie zaleca się także wykrywania piku hormonu luteinizującego (LH), badania śluzu szyjkowego

wego ani pomiarów podstawowej temperatury ciała. Metody te są jednak dopuszczalne w samodzielnej ocenie cyklu. U kobiet regularnie miesiączkujących nie znajduje zastosowania pomiar stężenia prolaktyny w warunkach podstawowych i po teście z metoklopramidem.^{1,3,4}

ROLA USG W CYKLU INDUKOWANYM

Monofolikularna indukcja jajczkowania to postępowanie mające na celu pobudzenie do wzrastania pęcherzyka jajnikowego u pacjentek cierpiących na przewlekły brak jajczkowania. Celem jest zawsze wzrost pojedynczego pęcherzyka jajnikowego.^{1,5,6}

Sposób indukcji owulacji zależy od przyczyny braku jajczkowania. Pacjentkom ze zdiagnozowaną hiperprolaktynemią podaje się leki z grupy agonistów receptora D_2 dopaminy. U pacjentek z zespołem policystycznych jajników (PCOS – polycystic ovary syndrome) stosuje się cytrynian klomifenu, gonadotropiny lub zabiegowo elektrokauteryzację jajników.⁵⁻¹⁰

Cytrynian klomifenu (CC) pozostaje lekiem pierwszego rzutu. Klomifen łączy się kompetytywnie z receptorami estrogenowymi w podwzgórzu przysadki mózgowej. Hamuje ujemne sprzężenie zwrotne między estradiolem a GnRH, tym samym powodując wzrost stężenia endogennych gonadotropin w surowicy krwi. CC jest lekiem tanim i z reguły dobrze tolerowanym. Charakteryzuje się małym (praktycznie żadnym) ryzykiem wystąpienia zespołu hiperstimulacji jajników (OHSS – ovarian hyperstimulation syndrome). Efekt działania cytrynianu klomifenu zależy od stopnia wzrostu stężenia gonadotropin. Istnieje ryzyko zarówno braku odpowiedzi na leczenie, jak i możliwość wzrastania kilku pęcherzyków jajnikowych. Pacjentki powinny zostać poinformowane o niewielkim ryzyku ciąży wielopłodowej. Kobiety, u których nie występuje owulacja, z zespołem policystycznych jajników i współistniejącymi zaburzeniami tolerancji glukozy, które nie odpowiedziały na monoterapię klomifenem, mogą dodatkowo otrzymać metforminę.^{8,10-12}

Negatywny skutek terapii cytrynianem klomifenu, wpływający na skuteczność leczenia, tj. odsetek ciąż klinicznych, przejawia się m.in.:

- zmianami w komórce jajowej i przedwczesną luteinizacją pęcherzyka jajnikowego spowodowaną wzrostem stężenia LH
- hamowaniem rozwoju endometrium i wydzielania śluzu szyjkowego z powodu antyestrogennego działania leku

- zablokowaniem ekspresji receptora estrogenowego oraz hamowaniem tworzenia pinopodów w nabłonku endometrium niezbędnych w procesie implantacji zarodka.

Antyestrogeny efekt działania klomifenu nie zależy bezpośrednio od dawki i powtarza się w kolejnych cyklach.

Cytrynian klomifenu przywraca owulację u około 70-80% pacjentek, a około 30-40% zachodzi w ciążę. Po podaniu klomifenu do owulacji dochodzi między 12 a 21 dniem cyklu. Pęcherzyki przedowulacyjne osiągają wymiary 16-35 mm.¹³⁻¹⁵ Leczenie CC powinno być ograniczone do 6 cykli. Alternatywnymi metodami indukcji jajczkowania po nieudanej stymulacji są inhibitory aromatazy, egzogenne gonadotropiny i w wybranej grupie pacjentów elektrokoagulacja jajników.¹⁶

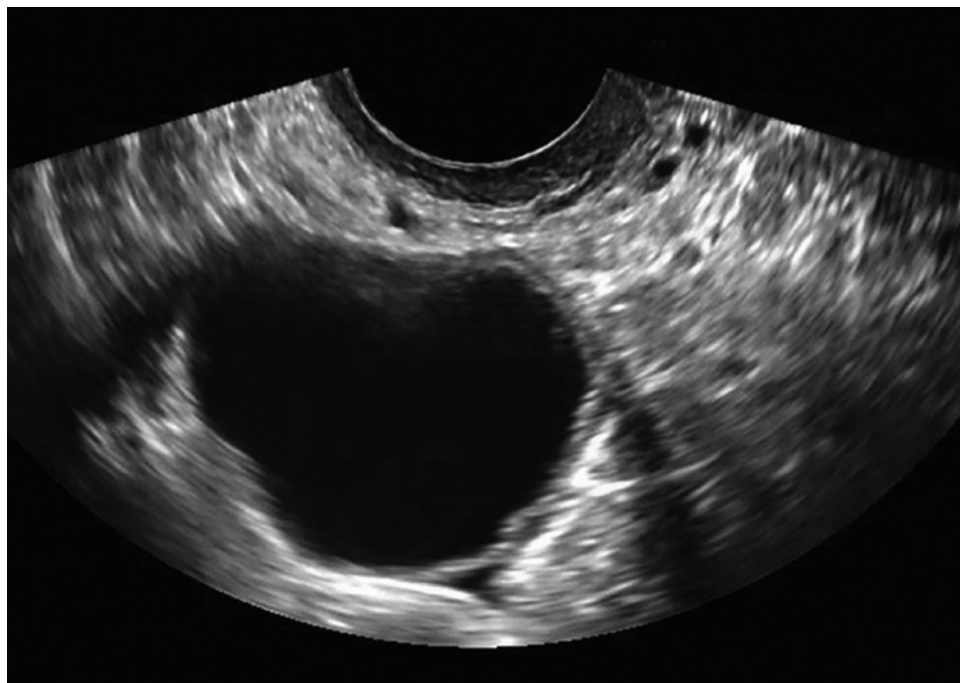
Gonadotropiny (gonadotropiny rekombinowane oraz wysoko oczyszczone moczopochodne preparaty gonadotropin menopauzalnych) są stosowane u pacjentek z PCOS w przypadku braku skuteczności terapii antyestrogenowej, czyli:

- braku odpowiedzi na stymulację klomifenem do dawki 100-150 mg/24 h
- braku ciąży po stymulacji klomifenem przy prawidłowej odpowiedzi na klomifen lub stwierdzanych nieprawidłowościach w odpowiedzi (objawy działania antyestrogenowego)

- poronienia po klomifenie
- u kobiet z zaburzeniami owulacji spowodowanymi hipogonadyzmem hipogonadotropowym.

Zaletą stosowania gonadotropin jest brak negatywnego wpływu na endometrium i większa skuteczność leczenia, minusem zaś – większe ryzyko rozwoju zbyt dużej liczby pęcherzyków, a tym samym ciąży wielopłodowej, oraz istotne ryzyko wystąpienia OHSS. Z powyższych powodów indukcja jajczkowania za pomocą gonadotropin powinna być wykonywana przez doświadczonego w tej dziedzinie specjalistę w ośrodku zapewniającym regularne monitorowanie ultrasonograficzne.

Bez względu na rodzaj zastosowanego leku (cytrynian klomifenu, gonadotropiny) monitorowanie cyklu indukowanego jest kluczowym procesem w ocenie prawidłowości, skuteczności i bezpieczeństwa terapii. Tymczasem CC jest często podawany bez nadzoru i obserwacji zjawisk w cyklu. Badanie USG umożliwia obserwację wzrostu pęcherzyka i grubości endometrium, pozwala wyłonić grupę pacjentek źle odpowiadających na terapię lub wręcz opornych na klomifen (25-30%), a tym samym skrócić czas tracony na nieskuteczną terapię. Monitorowanie cyklu z cytrynianem klomifenu pozwala na jednoznaczną ocenę wystąpienia/braku owulacji oraz określenie antyestrogennych efektów działania leku.¹⁶



Rycina 1. Pęcherzyk jajnikowy przed owulacją

Rycina 2. Pęcherzyk jajnikowy po owulacji w cyklu indukowanym



Niezbędnymi elementami prawidłowej terapii są monitorowanie cyklu indukowanego za pomocą seryjnych badań USG i ewentualne pomiary stężenia estradiolu w surowicy. Umożliwiają one ocenę wzrostu pęcherzyków jajnikowych i procesu jajczkowania, jednocześnie pozwalają uniknąć hiperstymulacji jajników i zminimalizować ryzyko ciąży wielopłodowej. Prawdopodobieństwo owulacji zwiększa się wraz ze średnicą pęcherzyka. Pęcherzyk jajnikowy przed owulacją przedstawiono na rycinie 1, a po owulacji na rycinie 2. Po podaniu ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG) pęcherzyki o średnicy 14 mm i mniejszej owulują rzadko, owuluje zaś około 40% pęcherzyków o średnicy 15-16 mm, 70% o średnicy 17-18 mm, 80% o średnicy 19-20 mm i niemal wszystkie większe pęcherzyki. Ryzyko ciąży wielopłodowej wzrasta wraz z liczbą pęcherzyków wykazujących prawdopodobieństwo owulacji. W związku z tym nie należy podawać hCG, jeśli ryzyko owulacji mnogiej jest wysokie, a celem jest owulacja monofolikularna. Duża liczba pośrednich i małych pęcherzyków zwiększa również ryzyko zespołu hiperstymulacji jajników (ryc. 3).¹⁷

ROLA USG W CYKLU STYMULOWANYM

Cykl stymulowany to cykl owulacyjny, w którym podawane są dodatkowo leki indukujące jajczkowanie (cytrynian klomifenu lub gonadotropiny) stosowane w celu pobudzenia do wzrastania kilku pęcherzyków jajnikowych. W odróżnieniu od cykli monofolikularnych stymulacja wzrastania

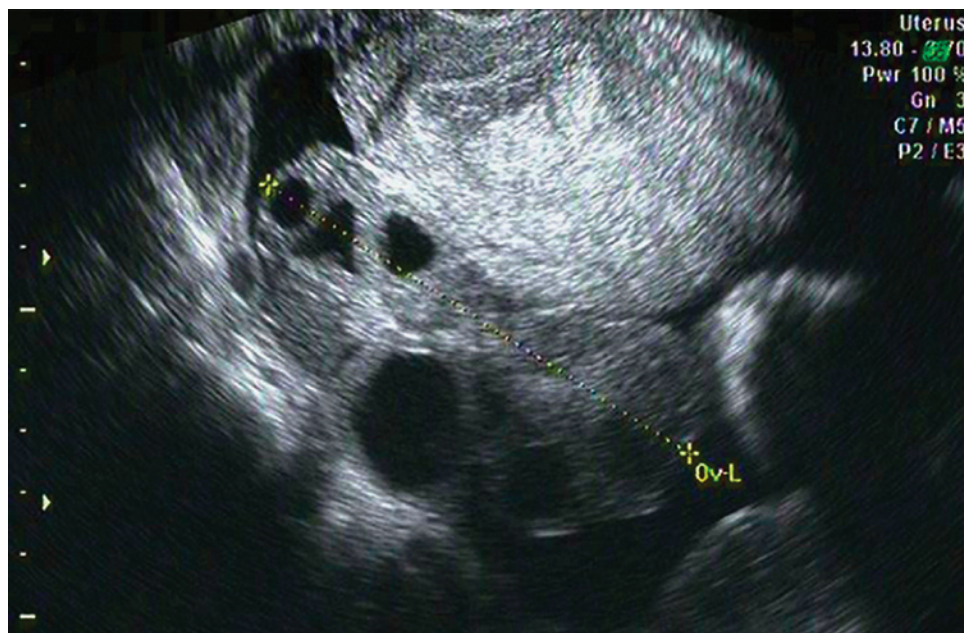
kilku pęcherzyków jajnikowych wiąże się z większym prawdopodobieństwem naturalnego zajścia w ciążę, ale również z istotnym zwiększeniem ryzyka ciąży wielopłodowych (0,3 vs 2,8%).¹⁸ W Polsce stymulacja jajczkowania nie jest zalecana w celu leczenia niepłodności. Należy podkreślić, że właśnie stymulacja jajczkowania (najczęściej CC), stosowana nierozważnie w celu leczenia niepłodności idiopatycznej, jest głównym czynnikiem ryzyka ciąży bliźniaczych oraz wielopłodowych wyższego rzędu.

ROLA USG W CYKLU HIPERSTYMULOWANYM

Cykl hiperstymulowany polega na kontrolowanej stymulacji wzrostu kilku-kilkunastu pęcherzyków jajnikowych, jest elementem programu zapłodnienia pozaustrojowego metodą IVF lub ICSI. Procedura zapłodnienia pozaustrojowego charakteryzuje się największym ryzykiem OHSS, ma jednak udowodnioną najwyższą skuteczność spośród wszystkich metod leczenia niepłodności.^{1,19} Odsetek ciąży klinicznych w przeliczeniu na cykl z zastosowaniem kontrolowanej hiperstymulacji wynosi średnio 30%, podczas gdy wartość ta w przypadku minimalnej stymulacji jajników jest istotnie niższa i oscyluje w granicach 10-15%.^{20,21}

W stymulacji mnogiego jajczkowania stosowane są najczęściej następujące protokoły: krótki lub długi z agonistą gonadoliberyny (GnRH) oraz protokół z antagonistą GnRH.

Monitorowanie polega na ocenie ilości i wielkości wzrastających pęcherzyków



Rycina 3. Zespół hiperstymulacji jajników (OHSS)

jajnikowych oraz receptywności endometrium. Pozwala na określenie optymalnego czasu na wykonanie zabiegu punkcji jajników w celu uzyskania dojrzałych komórek jajowych oraz podjęcie właściwej decyzji co do transferu zarodków.

Monitorowanie rozpoczyna się zwykle po kilku dniach przyjmowania leków stymulujących wzrost pęcherzyków i w uzasadnionych momentach uzupełniane jest oznaczeniami stężeń estradiolu (i niekiedy progesteronu) w surowicy. Wynik badania USG jest kluczowy w procesie kontrolowanej hiperstymulacji, pozwala bowiem na podjęcie decyzji o:

- przerwaniu stymulacji w przypadku braku właściwej reakcji jajnikowej
- kontynuacji stosowania gonadotropin z utrzymaniem lub zmianą ich dawki
- czasie podania hCG w celu wywołania ostatecznego dojrzewania pęcherzyków i maksymalizacji liczby pobranych dojrzałych komórek jajowych
- zmianie postępowania terapeutycznego w przypadku ryzyka OHSS, np. polegającej na zastąpieniu hCG agonistą GnRH w celu wywołania ostatecznego dojrzewania pęcherzyków (możliwe wyłącznie w protokole antagonistycznym).^{22,23}

Stymulacja zostaje przerwana w momencie osiągnięcia przez pęcherzyki jajnikowe średnicy 16-20 mm. Ocena hormonalna zdaje się mieć mniejsze znaczenie w kontroli stymulacji jajczkowania. Dotychczas nie wykazano przewagi monitorowania cyklu z zastosowaniem USG w połączeniu z ana-

lizą hormonalną nad samym badaniem USG w odniesieniu do ryzyka OHSS, skuteczności leczenia, definiowanej odsetkiem ciąż klinicznych, czy liczby uzyskanych komórek jajowych.^{24,25} Pomiar estradiolu jest zalecany z ostrożności, jako dobra praktyka kliniczna, zwłaszcza u kobiet z grupy dużego ryzyka OHSS (ryc. 4). Stosując USG z oceną hormonalną, należy rozważyć potencjalne korzyści i szkody dla pacjentki, w tym dodatkowe koszty i stres wywołany pobieraniem krwi.

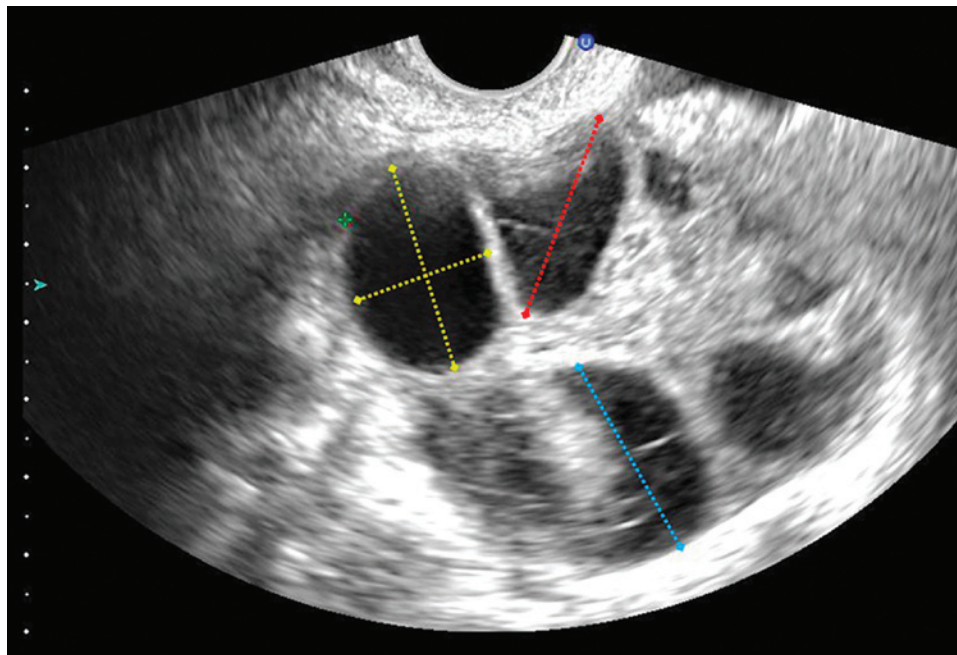
Ultrasonografia jest wykorzystywana również w pośredniej ocenie receptywności endometrium, a tym samym określaniu szansy na powodzenie implantacji zarodka. O dobrej receptywności endometrium w badaniu USG świadczą:

- grubość >7 mm o jednolitej echogeniczności
- obraz 3-warstwowy w dniu owulacji
- obraz jednolity w połowie fazy lutealnej
- skurcze macicy i „falowanie” endometrium o częstotliwości charakterystycznej dla poszczególnych faz cyklu.²⁶⁻²⁹

TECHNIKA BADANIA USG W OCENIE JAJCZKOWANIA

Podstawową techniką w ocenie jajczkowania jest ultrasonografia dwuwymiarowa (2D). W cyklu indukcji monofolikularnej pojedynczy pęcherzyk przedowulacyjny ma przeciętną średnicę 21 mm z widocznym wżgórkciem jajonośnym. W cyklu hiperstymulowanym natomiast o zakończeniu stymulacji i podaniu hCG w celu osiągnięcia ostatecznej dojrzałości komórek jajowych decyduje stwierdzenie

Rycina 4. Technika pomiaru pęcherzyka jajnikowego w USG



w USG co najmniej 1 pęcherzyka o średnicy ≥ 18 mm i co najmniej 2 pozostałych ≥ 16 mm. Technikę pomiaru pęcherzyka jajnikowego w USG przedstawiono na rycinie 4.

Zaawansowane techniki – ultrasonografia trójwymiarowa (3D) i trójwymiarowa angiografia power doppler (PD) – nie są rutynowo stosowane w tym procesie.^{24,30} Do właściwości USG 3D wskazujących na potencjalne korzyści w porównaniu z konwencjonalnym USG należą:

- automatyczny pomiar objętości i średnicy pęcherzyka jajnikowego
- krótszy czas pomiaru, co jest szczególnie istotne w monitorowaniu cyklu hiperstymulowanego z kilkoma, kilkunastoma pęcherzykami jajnikowymi
- mała zmienność pomiarów (ocena wielkości pęcherzyków jajnikowych na podstawie ich objętości)
- duża dokładność oceny pęcherzyków niesferycznych
- małe ryzyko pominięcia lub podwójnego pomiaru danego pęcherzyka.³¹⁻³³

Raine-Fenning i wsp.³⁰ w swoim badaniu nie stwierdzili jednak istotnych różnic w liczbie uzyskanych komórek jajowych i odsetku ciąż klinicznych w cyklach ocenianych z zastosowaniem USG 3D i 2D.

Badanie dopplerowskie pozwala na wykonanie pomiarów przepływu krwi w jajniku i endometrium. Prawidłowe unaczynienie ma decydujący wpływ na rozwój pęcherzyków jajnikowych i endometrium. Dlatego też nie

można wykluczyć rosnącej roli PD w selekcji komórek jajowych i określaniu okna implantacyjnego. Brak implantacji stanowi istotny powód niepowodzeń w leczeniu niepłodności z wykorzystaniem metod zapłodnienia pozastrojowego. Umiejętność nieinwazyjnej oceny receptywności endometrium przez ocenę przepływu krwi w jego obrębie może stanowić o sukcesie terapeutycznym.³⁴

PODSUMOWANIE

Ultrasonografia jest podstawową metodą obrazowania w położnictwie i ginekologii. Jako technika nieinwazyjna i niewykazująca praktycznie żadnych działań niepożądanych znalazła szerokie zastosowanie w diagnostyce i leczeniu niepłodności. Monitorowanie jajczkowania z zastosowaniem USG należy prowadzić podczas indukcji, stymulacji i hiperstymulacji jajczkowania. Jest to konieczne w celu oceny prawidłowości przebiegu i bezpieczeństwa procedury. Ponadto wynik badania USG pozwala na pośrednią ocenę receptywności endometrium, kluczowego parametru w procesie implantacji zarodka. W ocenie jajczkowania wystarczająca jest ultrasonografia 2D. Zaawansowane techniki USG (3D, PD) nie znajdują powszechnego zastosowania w tym procesie.

Autorem zdjęć jest dr Przemysław Ciepiela z Centrum Ginekologii i Leczenia Niepłodności VitroLive w Szczecinie oraz Zakładu Zdrowia Prokreacyjnego PUM w Szczecinie.

Adres do korespondencji: prof. dr hab. n. med. Rafał Kurzawa, VitroLive Sp. z o.o., al. Wojska Polskiego 103, 70-483 Szczecin; e-mail: rafal.kurzawa@pum.edu.pl

© 2015 Medical Tribune Polska Sp. z o.o.

Piśmiennictwo

1. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). *Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems*. London: Royal College of Obstetricians & Gynaecologists (UK); 2013.
2. Collins JA, Burrows EA, Wilan AR. The prognosis for live birth among untreated infertile couples. *Fertil Steril*. 1995;64(1):22-8.
3. Crosignani PG, Rubin BL. Optimal use of infertility diagnostic tests and treatments. The ESHRE Capri Workshop Group. *Hum Reprod*. 2000 Mar;15(3):723-32.
4. Kuczyński W, Kurzawa R, Oszkowiński P, Pawełczyk L, Poręba R, Radowski S, Spaczyński R, Szamatowicz M, Wolczyński S. Rekomendacje dotyczące diagnostyki i leczenia niepłodności. Sekcja Płodności i Niepłodności Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, Polskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu. 2014. www.spin.org.pl.
5. Amer SA, Li TC, Metwally M, Emarih M, Ledger WL. Randomized controlled trial comparing laparoscopic ovarian diathermy with clomiphene citrate as a first-line method of ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2009;24(1):219-25.
6. Hamilton-Fairley D, Kiddy D, Watson H, Sagle M, Franks S. Low-dose gonadotrophin therapy for induction of ovulation in 100 women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 1991;6(8):1095-9.
7. Hughes E, Brown J, Collins J, Vandekerckhove P. Clomiphene citrate for unexplained subfertility in women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(1):CD000057.
8. Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Bush A, Short F, Anyaoku V, Reed MJ, Franks S. Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1992;36(1):105-11.
9. Kousta E, White DM, Franks S. Modern use of clomiphene citrate in induction of ovulation. *Hum Reprod Update*. 1997;3(4):359-65.
10. 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.
11. Neveu N, Granger L, St-Michel P, Lavoie HB. Comparison of clomiphene citrate, metformin, or the combination of both for first-line ovulation induction and achievement of pregnancy in 154 women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2007;87(1):113-20.
12. Zain MM, Jamaluddin R, Ibrahim A, Norman RJ. Comparison of clomiphene citrate, metformin, or the combination of both for first-line ovulation induction, achievement of pregnancy, and live birth in Asian women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2009;91(2):514-21.
13. Macgregor AH, Johnson JE, Bunde CA. Further clinical experience with clomiphene citrate. *Fertil Steril*. 1968;19(4):616-22.
14. Gysler M, March CM, Mishell DR Jr, Bailey EJ. A decade's experience with an individualized clomiphene treatment regimen including its effect on the postcoital test. *Fertil Steril*. 1982;37(2):161-7.
15. Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC. A nomogram to predict the probability of live birth after clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligomenorrheic infertility. *Fertil Steril*. 2002;77(1):91-7.
16. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012;98(2):302-7.
17. Youssef MA, Van der Veen F, Al-Inany HG, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist versus HCG for oocyte triggering in antagonist-assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Oct 31;10:CD008046.
18. van Rumste MM, Custers IM, van der Veen F, van Wely M, Evers JL, Mol BW. The influence of the number of follicles on pregnancy rates in intrauterine insemination with ovarian stimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2008;14(6):563-70.
19. Soliman S, Daya S, Collins J, Jarrell J. A randomized trial of in vitro fertilization versus conventional treatment for infertility. *Fertil Steril*. 1993;59(6):1239-44.
20. Gnath C, Maxrath B, Skonieczny T, Friol K, Godehardt E, Tigges J. Final ART success rates: a 10 years survey. *Hum Reprod*. 2011;26(8):2239-46.
21. Peilnick MJ, Vogel NE, Hoek A, et al. Cumulative pregnancy rates after three cycles of minimal stimulation IVF and results according to subfertility diagnosis: a multicentre cohort study. *Hum Reprod*. 2006;21(9):2375-83.
22. Nastro CO, Ferriani RA, Rocha IA, Martins WP. Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology and prevention. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27(2-3):121-8.
23. Humaidan P, Papanikolaou EG, Kyrrou D, et al. The luteal phase after GnRH-agonist triggering of ovulation: present and future perspectives. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(2):134-41.
24. Kwan I, Bhattacharya S, Kang A, Woolner A. Monitoring of stimulated cycles in assisted reproduction (IVF and ICSI). *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;8:CD005289.
25. Martins WP, Vieira CV, Teixeira DM, Barbosa MA, Dassunção LA, Nastro CO. Ultrasound for monitoring controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014;43(1):25-33.
26. Yuval Y, Lipitz S, Dor J, Achiron R. The relationships between endometrial thickness, and blood flow and pregnancy rates in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1999;14(4):1067-71.
27. De Geyter C, Schmitter M, De Geyter M, Nieschlag E, Holzgreve W, Schneider HP. Prospective evaluation of the ultrasound appearance of the endometrium in a cohort of 1,186 infertile women. *Fertil Steril*. 2000;73(1):106-13.
28. Kovacs P1, Matyas S, Boda K, Kaali SG. The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod*. 2003;18(11):2337-41.
29. Zhang X, Chen CH, Confino E, Barnes R, Milad M, Kazer RR. Increased endometrial thickness is associated with improved treatment outcome for selected patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*. 2005;83(2):336-40.
30. Raine-Fenning N, Deb S, Jayaprakasan K, Clewes J, Hopkinson J, Campbell B. Timing of oocyte maturation and egg collection during controlled ovarian stimulation: a randomized controlled trial evaluating manual and automated measurements of follicle diameter. *Fertil Steril*. 2010;94(1):184-8.
31. Raine-Fenning N, Jayaprakasan K, et al. SonoAVC: a novel method of automatic volume calculation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;31(6):691-6.
32. Ata B, Seyhan A, Reinblatt SL, Shalom-Paz E, Krishnamurthy S, Tan SL. Comparison of automated and manual follicle monitoring in an unrestricted population of 100 women undergoing controlled ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod*. 2011;26(1):127-33.
33. Murtlinger M, Aburumieh A, Rubner P, Eichel V, Zech MH, Zech NH. Improved monitoring of ovarian stimulation using 3D transvaginal ultrasound plus automated volume count. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(5):695-9.
34. Záčková T, Järvelä IY, Tapanainen JS, Feyereis J. Assessment of endometrial and ovarian characteristics using three dimensional power Doppler ultrasound to predict response in frozen embryo transfer cycles. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;25(7):151.