

Marija Gačič¹, Veljko Vlajsavljević², Helena Meden Vrtovec³

Indukcija ovulacije v postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo

Ovulation Induction in Assisted Reproduction Technologies

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: indukcija ovulacije

Od prve faze razvoja zdravil za indukcijo ovulacije je minilo že več kot 50 let. V tem času so se razvili novi pripravki, uporabljeni v različnih protokolih in različnih odmerkih, toda doslej še ni bil oblikovan protokol, ki bi bil ustrezen za vse ženske. Uspešnost indukcije ovulacije v postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo namreč ni odvisna le od pripravkov, temveč tudi od ključnih dejavnikov, kot so: starost ženske, značilnosti menstrualnega ciklusa, indeks telesne teže, rezerva jajčnikov in pridružene bolezni. Prva uspešna nosečnost v postopku oploditve z biomedicinsko pomočjo je bila rezultat zunajtelesne oploditve v naravnem ciklusu brez uporabe zdravil. Zaradi sorazmerno majhne stopnje uspešnosti so pri teh postopkih naravni ciklus že v sedemdesetih letih nadomestili protokoli z uporabo klomifen citrata ali gonadotropinov. Največji napredek na tem področju je bilo uvajanje agonistov gonadoliberilina. Uporaba humanih menopavznih gonadotropinov in rekombinantnih oblik (rekombinantni FSH, rekombinantni LH, rekombinantni HCG) v kombinaciji z agonisti GnRH je privedla do večje stopnje nosečnosti (20–60%) pa tudi do večjega odstotka večplodnih nosečnosti in ovarijske hiperstimulacije. Zato so se ponovno začeli uveljavljati principi, po katerih se uvajajo cenejši, manj zapleteni in prijaznejši protokoli, ki ob naravnem ciklusu, minimalni in blagi ovarijski stimulaciji (uporaba klomifen citrata in letrozola ter majhnih odmerkov humanega menopavznega gonadotropina (HMG) ali rFSH) omogočajo uspešno indukcijo ovulacije in nosečnost pri približno 30% zdravljenih žensk. Po pol stoletja razvijanja sofisticiranih protokolov ovarijske stimulacije so sodobna evropska priporočila usmerjena v manj agresivne, cenejše, dovolj učinkovite in prijaznejše metode spodbujanja ovulacije v postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo.

ABSTRACT

KEY WORDS: ovulation induction

More than 50 years have passed from the developmental phase of ovulation induction. During this period, new medications have been introduced and new protocols and dosages have been established, but a regimen that would suit all women has not yet been found. The success of ovulation induction in assisted reproduction technologies (ART) does not depend only on the medications used, but is also influenced by contributing key factors, such as the woman's age and the characteristics of her menstrual cycle, as well as her body mass index, ovarian reser-

¹ Marija Gačič, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana; marija8marija@yahoo.co.uk

² Prof. dr. Veljko Vlajsavljević, dr. med., višji svetnik, Oddelek za reproduktivno in ginekološko endokrinologijo, Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

³ Prof. dr. Helena Meden Vrtovec, dr. med., višja svetnica, Ginekološka klinika v Ljubljani, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šlajmerjeva 3, 1525 Ljubljana

ve and concomitant diseases. The first successful pregnancy followed natural cycle ART without medications. Because of a relatively low success rate, natural cycle was replaced in 1970's with protocols that included clomiphene citrate or gonadotropins. The introduction of gonadoliberin agonists represented the greatest advantage in this field. The use of human menopausal gonadotropins and the recombinants, namely recombinant FSH, recombinant LH and recombinant HCG in combination with GnRH agonists, has resulted in significantly higher pregnancy rates (cumulative up to 65%), but also in higher multiple pregnancy rates and ovarian hyperstimulation rates. This is why the use of cheaper, less complicated and more patient friendly principles has been renewed, including natural cycle, as well as methods for minimal and mild ovarian stimulation (use of clomiphene citrate, letrozole and small doses of human menopausal gonadotropin HMG or rFSH) that enable ovulation induction and pregnancy in about 30% of treated women. After half a century of developing sophisticated protocols of ovarian stimulation, modern European recommendations now favour the use of less aggressive and cheaper, as well as more effective and patient friendly methods of ovulation induction in ART.

UVOD

Številni in različni protokoli ovarijske stimulacije v postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo (OBMP) so posledica dejstva, da ne poznamo idealnega protokola, ki bi bil ustrezen za vse ženske. Zato so vrste in načini uporabe zdravil odvisni od starosti ženske, od odzivnosti in od morebitne predhodne ovarijske stimulacije in od rezerve jajčnika (1). Ob upoštevanju omenjenih dejstev je OBMP mogoča v naravnem ciklusu, v minimalno ali blago stimuliranem ciklusu in v ciklusu z nadzorovano ovarijsko hiperstimulacijo (NOH). Izbor ovarijske stimulacije je eden ključnih elementov OBMP in je v veliki meri povezan z uspešnostjo postopkov. Odločitev za določen protokol mora biti prilagojena individualni značilnosti žensk ob upoštevanju bistvenih dejavnikov, ki lahko vplivajo na izid zdravljenja: indikacija za uvedbo postopka, starost ženske, telesna teža in značilnosti menstrualnega ciklusa. Protokol ovarijske stimulacije mora biti usklajen tudi s koncentracijo, morfologijo in gibljivostjo semenčic pri partnerju.

FIZIOLOGIJA JAJČNIKA

V jajčniku potekata dve dejavnosti, gametogeneza in steroidogeneza, ki sta odvisni od cikličnih sprememb v koncentracijah gonadotropinov, estrogenov, androgenov in progesterona. Na ravni ovarija imata folikulotropin (FSH) in lutropin (LH) različno delovanje.

FSH inducira mitozo granuloznih celic v foliklu in receptorje FSH v granuloznih celicah, inducira aktivnost aromataze in nastajanje estradiola, inducira receptorje LH v granuloznih celicah in celicah teka, steroidogenezo v rumenem telesu in uravnava učinke lokalnih dejavnikov. LH pa inducira steroidogenezo v celicah teka, ovulacijo, steroidogenezo v rumenem telesu in uravnava učinke lokalnih dejavnikov.

Gametogeneza poteka v naslednjem zaporedju. Folikularna faza je faza rasti in zorenja folikla. V foliklu, ki je temeljna funkcionalna enota jajčnika, zori jajčna celica in se sintetizirajo spolni hormoni. Jajčna celica, ki je v profazi prve miotične delitve, je obdana z granuloznimi celicami in je z bazalno membrano ločena od drugih delov folikla. Folikel se razvija iz primordialnega v preantralni, antralni in predovulatorni folikel. Primordialni folikel vsebuje jajčno celico in le en sloj granuloznih celic. Razvoj do te faze poteka intrauterino in ni odvisen od gonadotropinov. Za nadaljnji razvoj in rast pa je nujna stimulacija s FSH. Iz primordialnega nastane primarni folikel, ki ima prav tako le en sloj granuloznih celic, le da so večje in kuboidne oblike. Naslednja razvojna faza je preantralni folikel, v katerem se jajčna celica večja in je obdana z mukopolisaharidno ovojnico, imenovano *zona pellucida*. Granulozne celice razvijajo receptorje za FSH in poveča se indukcija steroidogeneze. Steroidi še naprej in bolj spodbujajo nastajanje receptorjev za FSH (angl. *up-regulation*) in v fazi maksimal-

nega števila receptorjev za FSH se z druge strani bazalne membrane organizirajo celice teka, ki imajo membranske receptorje za LH, ki spodbujajo nastajanje testosterona in androstendiona. Oba se aromatizirata v estrogene, pod vplivom α -reduktaze pa nastaja tudi dihidrotosteron (DHT), ki spodbuja apoptozo in atrezijo folikla. Rast in atrezija foliklov je kontinuiran proces, ki poteka vse življenje, tudi intrauterino. S sinergističnim delovanjem FSH in estradiola prične nastajati folikularna tekočina, ki oblikuje posebno votlino, imenovano *antrum folliculi*. Antralni folikel se zaradi večanja količine folikularne tekočine in števila granuloznih celic poveča (do 15-krat) in proizvaja velike količine estradiola.

Razvoj od preantralnega do predovulacijskega folikla traja 85 dni, kar pomeni tri menstruacijske cikle. Zgodnji antralni folikel dozoreva do predovulacijskega 70 dni, kar pomeni, da se začeta rast in razvoj folikla, ki bo ovuliral, precej pred aktualnim ciklusom, v katerem pride do ovulacije. Rast antralnega folikla je dolga faza, sledi ji druga, hitra faza, ki traja 15 dni. V tej fazi eden od antralnih foliklov v premeru od 2 do 4 mm prične hitro rasti in doseže v predovulacijski fazi premer od 20 do 25 mm. V vsakem jajčniku je v reproduktivni dobi vedno od 10 do 45 antralnih foliklov različnih velikosti (od 1 do 15 mm).

Razlika med folikli je v njihovi skladnosti interakcij med gonadotropinsko stimulacijo in posledično dejavnostjo encimov aromataze in reduktaze, razmerjem med estradiolom in androgeni, ki v optimalnih pogojih (kasni antralni folikel > 12 mm) razvijajo tudi receptorje za LH na membranah granuloznih celic. Ko se razvijajo receptorji za LH, se prične tudi proizvodnja progesterona. Antralni folikel, ki v premeru meri 15 mm v 4 do 5 dneh zraste in dozori v predovulacijski folikel, ki v premeru meri od 20 do 25 mm in vsebuje od 5 do 10 ml folikularne tekočine. Encimska dejavnost se v tem času poveča do 1000-krat. Proizvodnja estradiola narašča vse od 24 do 36 ur pred ovulacijo, ko se zaradi začetne luteinizacije granuloznih celic prične tudi proizvodnja progesterona. Sinergizem s progesteronom ob visoki koncentraciji estradiola izzove pozitivno povratno zvezo z LH, čemur sledi ovulacijski vrh LH, ki ga spremlja manjši

porast v koncentraciji FSH. Porast LH je spodbuda za zorenje in mejotično delitev jajčne celice, FSH inducira nastajanje hialuronske kisline v celicah kumulusa, kar je pogoj, da se kompleks kumulus, *corona radiata* in oocit loči od foliklove stene in je mogoča ovulacija. LH spodbuja sintezo androgenov v celicah teka, sledi predovulacijski porast androstendiona in testosterona, kar vodi tudi v porast libida. V granuloznih celicah predovulacijskega folikla nastajajo proteolitični encimi in prostaglandini, ki razgradijo foliklovo steno, da se stanjša na omejenem mestu, ki ga označujemo kot *stigma folliculi*. Kontrakcije okolnih miofibril povzročijo ekspulzijo oocita prek stanjšane foliklove stene. Do ovulacije pride od 36 do 38 ur po začetku vrha LH, v poletnih mesecih jutraj, jeseni in pozimi pa v večernih urah.

Po ovulaciji sledi lutealna faza, ko v foliklu nastaja rumeno telesce (lat. *corpus luteum*) prek naslednjih razvojnih faz. Najprej folikel napolnita kri in limfa (lat. *corpus haemorrhagicum*), nato se granulozne celice povečajo, vakuolizirajo in kopičijo pigment lutein. Prične se živahna angiogeneza, ki omogoča dobro prekrvavitev rumenega telesca in intenzivno proizvodnjo progesterona. Če je v predovulacijski fazi malo granuloznih celic, manj estradiola in FSH, je tudi delovanje rumenega telesca okrnjeno. Rumeno telesce proizvaja poleg progesterona tudi estradiol, oba pa sta odgovorna za transformacijo endometrija in pripravo za implantacijo. Sinergistično delovanje estradiola in progesterona ustvarja negativno povratno zvezo za gonadotropine, kar povzroča novo folikulogenezo. V rumenem telescu doseže proizvodnja hormonov maksimalne vrednosti 8 dni po ovulaciji. Rumeno telesce deluje od 12 do 14 dni, če pa pride do nosečnosti, se horionski gonadotropin (HCG) veže na receptorje LH in vzdržuje rumeno telesce še 8 do 12 tednov. Estradiol in endometrijski prostaglandini delujejo luteolitično, zato delovanje rumenega telesca usiha, zveča se fibroza, nastane belo telesce (lat. *corpus albicans*). Zaradi lokalnega delovanja hormonov rumenega telesca je inhibirana nova folikulogeneza v tem jajčniku, zato je v 60–70 % nova ovulacija v kontralateralnem jajčniku (1).

Poznavanje fiziologije jajčnika je pomembno za razumevanje protokolov indukcije ovulacije. Pri konvencionalnih postopkih indukcije ovulacije začnemo s stimulacijo že zgodaj v menstrualnem ciklusu in tako delujemo na celotno kohorto vseh antralnih foliklov. Pri blagi stimulaciji začnemo kasneje in le vzpodbudimo že naravno izbran folikel. Pri naravnem ciklusu pa smo v začetku povzročali spremembe v dominantnem foliklu, sedaj pa uporabljamo modificiran naravni cikel, s katerim minimalno vzpodbudimo naravno izbrane folikle, da iz njih nastane čim bolj kakovosten dominantni folikel, in tako pridobimo le eno jajčno celico ter morebiti še drugo iz kodominantnega folikla.

NARAVNI CIKLUS

Prva uspešna nosečnost v postopku OBMP je bila rezultat zunajtelesne oploditve v naravnem ciklusu brez uporabe induktorjev ovulacije. Izkazalo se je, da je v naravnem ciklusu veliko možnosti, da pride do prezgodnjega izločanja (LH), ki okvari zorečo jajčno celico in onemogoča oploditev, zato se je pričelo obdobje uvajanja različnih oblik stimulacije jajčnikov (2). V zadnjih letih pa zanimanje za uvajanje naravnega ciklusa v postopke OBMP spet narašča predvsem zaradi velikega napredka v laboratorijski tehnologiji in zaradi boljšega poznavanja fizioloških procesov, udeleženih pri gametogenezi. Med pomembnimi dejavniki, ki opravičujejo renesanso naravnega ciklusa, so tudi neugodne posledice stimuliranih ciklusov: visok strošek zdravljenja, velik odstotek večplodnih nosečnosti (do 30%), večji delež prezgodnjih porodov in občasni pojavi sindroma ovarijske hiperstimulacije (5, 6). Te pasti postopkov nadzorovane hiperstimulacije ovarijev lahko danes prebrodimo s shranjevanjem zarodkov z zamrzovanjem.

Pogoja za uvedbo naravnega ciklusa v postopek OBMP sta potrjen obstoj ovulacijskih ciklusov in redne menstruacije. Enostavneje ga izvedemo pri normalnem izvidu analize semenskega izliva, vendar je enako uspešen tudi takrat, ko gre za moško neplodnost, zato moramo uporabiti metodo injiciranja semenčice v citoplazmo jajčne celice (ICSI), čeprav imamo na voljo le eno jajčno celico (3, 4). Ob

upoštevanju navedenih dejavnikov so možnosti za uspešen postopek pri ženskah, starih do 35 let, dvajset odstotne (7). Indikacijsko območje naravnega ciklusa pa obsega tudi vključevanje tistih žensk, pri katerih bi se bilo zaradi njihovega zdravstvenega stanja bolj izogniti tveganjem, ki jih stimulacija prinaša (npr. ženske s hormonsko odvisnimi spremembami v dojkah ali pri ženskah v postopku OBMP zaradi zamrzovanja zarodkov pred onkoterapijo hormonsko odvisnih tumorjev). Nekateri avtorji predlagajo naravni cikel tudi pri tistih ženskah, ki so bile večkrat neuspešne v stimuliranih postopkih OBMP, vendar je ta indikacija le zasilni izhod pri iskanju primerne oblike ovarijske odzivnosti (8, 9).

V naravnem ciklusu pričnemo izvajati nadzor nad rastjo foliklov od devetega dne menstruacijskega ciklusa naprej z dnevnim merjenjem serumske koncentracije estradiola, določanjem LH v urinu in merjenjem rasti foliklov z vaginalnim ultrazvokom. Ko so izpolnjeni kriteriji, ki veljajo za predovulacijski folikel (> 16 mm v premeru, estrogen (E2) > 104 pg/mL oziroma > 0,39 mmol/L), dodamo horionski gonadotropin (HCG) 5000 IE ali rekombinantni LH (rLH) 15000 IE, kar omogoči dokončno zorenje jajčne celice. Tako ohranimo nadzor nad začetkom procesa končne faze zorenja folikla, ki bi ga sprožilo izločanje naravnega LH. Zato je takšen postopek primerneje imenovati »nadzorovani naravni cikel«.

Čeprav se aplikacija antagonistov gonadolibarina (antagonistov GnRH) pri velikosti vodilnega folikla 12–14 mm, ki mu sledi še tri dni aplikacije 150 IE humanega menopavznega gonadotropina (HMG) ali rekombinantnega FSH (rFSH) dnevno do aplikacije HCG, obravnava po nekaterih avtorjih kot »modificiran naravni cikel«, bi ga bilo boljše klasificirati kot minimalno oziroma blago stimulacijo (9).

Iz pregleda literature (8) o naravnem ciklusu lahko ugotovimo, kakšna je učinkovitost. Dvajset izbranih študij je zajelo skupaj 1800 ciklusov in 819 prenosov zarodka (45,5% na cikel) s 129 nosečnostmi: 7,2% na cikel in 15,8% na prenos zarodka. Višja starost matere ima negativno napovedno vrednost za izid postopka OBMP, čeprav so poročali, da so tudi starejše ženske po neuspešni stimu-

laciji zanosile v naravnem ciklusu OBMP (9–12). Če upoštevamo dejstvo, da ima naravni ciklus OBMP malo tveganj, nizke stroške in da je pacientkam prijazen postopek, se moramo strinjati z Edwardsom, ki predlaga, da je prišel čas za ponovno presojo o indikacijah za postopke OBMP, za *in vitro* maturacijo (IVM), naravni ciklus in OBMP z minimalno stimulacijo (13).

MINIMALNA IN BLAGA STIMULACIJA

Minimalna stimulacija folikulogeneze vključuje uporabo antiestrogenov klomifen citrata ali aromataznih inhibitorjev.

Klomifen citrat

Klomifen citrat (CC) je mešanica dveh stereozomerov učinkovine. Okoli 85 % vzete doze se eliminira v tednu dni po zaužitju. Biološko manj aktiven izomer ostane dokazljiv v serumu tudi več tednov.

Klomifen citrat inducira sproščanje FSH in tako vzpodbudi procese, ki vodijo v ovulacijo. Glavno prijemališče CC je blokada estrogenskih receptorjev in posledičen padec nivoja estrogena (E2) v krvi. Zaradi kompetitivne blokade receptorjev E2 tudi na hipotalamusu (HT) CC ponovno vzpostavi pulzatilno aktivnost in sekrecijo GnRH. Posledično se izločata FSH in LH, kar pospeši razvoj foliklov in ovulacijo. Ker ima CC estrogeno učinkovitost tudi na nivoju ovarija in hipofize, se poveča učinkovitost delovanja spodbujevalcev folikulogeneze na vseh nivojih osi ovarij-hipofiza-hipotalamus. Zato ima CC negativen vpliv na HT (poveča sekrecijo gonadoliberina), pozitiven vpliv na hipofizo (izločanje luteotropina), pozitiven vpliv na ovarij (senzibilizacija receptorjev FSH v granulozii). CC ima tudi neželen negativen antiestrogen učinek: negativen vpliv na cervikalno sluz (manjši volumen in konsistenca) ter negativen vpliv na endometrij (tanek endometrij in vpliv na ožiljenje). Zadnjih 40 let je CC zdravilo izbora za ženske brez ovulacij ali z nerednimi ovulacijami ob normalnih bazalnih vrednostih estradiola (skupina amenorej II po Slovenski zdravstveni organizaciji, posebej tiste, povezane s sindromom policističnih jajčnikov – PCOS). CC se v OBMP postopkih

uporablja za povečanje števila razvijajočih se foliklov (zaželeno 2 ali več). CC se daje oralno 50–150 mg 5 dni, od drugega do petega dne spontane ali inducirane menstruacije. Začetni dan zdravljenja in odmerki, večji kot 150 mg, ne vplivajo na izid oziroma nimajo boljših učinkov (18).

Eksogeni humani HCG apliciramo, ko vodilni folikel doseže ehografske kriterije popolne zrelosti. Uporaba antagonistov GnRH lahko prepreči prezgodnji porast LH. Zaradi tega je delež ciklusov, ki jih izključimo iz postopka stimulacije pred punkcijo foliklov, nižji kot pri naravnem ciklusu, večja je tudi stopnja zanositev (19). Zaradi majhnih stroškov je stimulacija s CC ponovno vzbudila zanimanje tistih terapevtov, ki želijo prijaznejši in cenejši postopek OBMP. Uspešnost s CC stimiliranih OBMP ciklusov variira med različnimi centri in je najbolj odvisna od starosti ženske ter od drugih vključitvenih kriterijev. Poročajo o 28 % kliničnih nosečnosti na začetni ciklus in 34 % na prenos zarodka pri normalno odzivnih in mlajših od 35 let, do 8–10 % pri slabo odzivnih (20, 21). Zdravljenje s CC in nizkimi odmerki gonadotropinov izzove razvoj večjega števila foliklov kot zdravljenje s samim CC (21, 22). Dodatek antagonistov GnRH uspešno zmanjša verjetnost za prezgodnji porast LH, poveča pa tudi stroške (20). Antagoniste GnRH dodamo pod istimi pogoji kot pri naravnem ciklusu.

Aromatazni inhibitorji

Letrozol je najpogosteje predpisan inhibitor aromataze (IA), ki se najpogosteje uporablja za zdravljenje napredovalega karcinoma dojke pri ženskah v pomenopavzi. Zavira biosintezo estrogena preko zaviranja encima aromataze, ki pretvori androstenedion v estrogen. Lastnost aromataznih inhibitorjev je, da znižajo koncentracijo estrogena v ovariju in krvi. Dvig koncentracije androgenov znotraj jajčnikov stimulira sintezo receptorjev FSH v celicah granuloze in tako izboljša občutljivost foliklov na stimulacijo s folitropinom. Z napredovanjem rasti foliklov se povečuje izločanje E2 in znižuje izločanje FSH, kar je pogoj za razvoj (zaželeno) le enega folikla (23). Uporaba IA nima neželenih učinkov na cervikalno sluznico oziroma endometrij kot pri s CC stimiliranih ciklusih. V primerjavi s CC, ki se veže na receptorje za daljše obdobje

je, je razpolovni čas IA le 45 ur. Letrozol je v uporabi kot induktor ovulacije od leta 2001.

Običajni odmerek letrozola je 2,5–5 mg na dan, pet dni v ciklusu, običajno od tretjega do sedmega dne ciklusa. Dnevni odmerek podobnega anastrazola je 1 mg na dan. Uporablja se za indukcijo ovulacije predvsem pri ženskah z nepojasnjeno neplodnostjo in pri intrauterini inseminaciji. Poročajo o višji stopnji zanositev kot pri CC (25).

Dodatek majhnih odmerkov FSH (150 IE vsake dva dni) poveča število predovulatornih foliklov, kot poročajo Healey in sodelavci (26).

NADZOROVANA OVARIJSKA HIPERSTIMULACIJA

Namen nadzorovane ovarijske hiperstimulacije (NOH) je spodbujanje rasti in razvoja večjega števila ovarijskih foliklov, kar omogoči, da je na razpolago več jajčnih celic, sposobnih oploditve. Ker se pri NOH proizvajajo suprafiološke količine estradiola, se pri 15–25 % žensk zaradi pozitivne povratne zveze prične prezgodnji porast LH s posledično prezgodnjo luteinizacijo foliklov in prekinitivijo postopkov. Temu procesu se lahko izognemo (zlasti pri ženskah s sindromom policističnih jajčnikov) z uporabo agonistov GnRH ali antagonistov GnRH. Zato je izbor protokola ovarijske stimulacije danes prilagojen individualnim posebnostim pozamezne ženske, ker ima vsak od protokolov svoje prednosti in slabosti.

Več desetletij so osnovne pripravke gonadotropinov, ki so vsebovali enako količino FSH in LH pridobivali z ekstrakcijo učinkovine iz urina pomenopavznih žensk. Čeprav so bili ti preparati zelo učinkoviti pri indukciji ovulacije, je bil postopek zbiranja velikih količin urina in odstranjevanje neželenih proteinov precej težaven. Z današnjimi bolj izpopolnjenimi tehnikami separacije gonadotropinov iz urina imamo na voljo prečiščene preparate, ki vsebujejo humani menopavzni gonadotropin (HMG), pri katerih sta FSH in LH v razmerju 1 : 1, in tiste, pri katerih je prevladujoča učinkovina FSH (27). Razvoj tehnologij pridobivanja rekombinantne DNA je omogočil sintezo rekombinantnega FSH (rFSH) (na voljo od leta 1996) in prav tako tudi rekombinantnega LH (rLH) ter rekombinantnega

humanega horionskega gonadotropina (rHCG). Učinkovitosti HMG in rekombinantnih pripravkov so si podobne, kot potrjujejo metaanalize randomiziranih kontroliranih raziskav. Prednost rFSH je zvečana biološka učinkovitost odmerkov, natančno odmerjanje učinkovine, uniformnost izomerov gonadotropinov v enoti učinkovine, možnost podaljševanja biološke aktivnosti in depo oblik foliotropinov ter popolna varnost pred prenosom nezaželenih proteinov iz urina (28–30).

Od uvedbe agonistov GnRH v poznih osemdesetih letih prejšnjega stoletja se gonadotropini kot monoterapija uporabljajo le v posebnih okoliščinah in primerih (slabo odzivne pacientke, insuficienca hipotalamusa ali hipofize – panhipopituitarizem). Uvedba agonistov gonadotropinov v protokole NOH je dogodek, ki je najbolj vplival na povečanje uspešnosti postopkov OBMP

Standardni protokol stimulacije z gonadotropini se začne z odmerki 150, 225 ali 250 IE FSH. Začetni odmerek ne vpliva na izid stimulacije pri ženskah z normalnimi ovulacijami in koncentracijami gonadotropinov v krvi. Pri ženskah, starejših od 35 let, nekatere predlagajo začetne odmerke 225 ali 250 IE, vendar do sedaj še ni dokazov, da bi bili višji odmerki učinkovitejši pri indukciji ovulacije kot manjši (150 IE FSH). V ciklusih, v katerih predhodno uporabljamo zdravila za desenzibilizacijo hipofize, so začetni odmerki med 150 in 450 IE rFSH ali HMG dnevno, odvisno od starosti ženske in ovarijske rezerve.

Metaanalize podatkov iz različnih prospektivnih randomiziranih raziskav, ki obravnavajo učinkovitost in rezultate postopkov OBMP v ciklusih, stimuliranih z rFSH ali HMG z analogi ali brez njih, ne kažejo bistvenih razlik med posameznimi uporabljenimi pripravki. Dokazano je le, da je rFSH čistejši in zato varnejši ter da so pri rFSH potrebni manjši odmerki za uspešno indukcijo ovulacije v primerjavi s HMG (31, 32).

AGONISTI GnRH IN EKSOGENI GONADOTROPINI

Protokoli stimulacije ovulacije, ki so kombinacija uporabe agonistov GnRH in gonadotropinov, so danes najpogosteje uporabljeni protokoli za postopke OBMP. Veljajo za »zla-

ti standard« in jih v Evropi uporabljajo v več kot 75 % vseh ciklusov stimulacije za OBMP.

Agonisti GnRH se reverzibilno vežejo na receptorje za GnRH z afiniteto, ki je 100-krat večja od afinitete naravnega GnRH. Mehanizem delovanja agonista GnRH ima dve fazi: stimulatorno in inhibitorno. Takoj po aplikaciji opazimo začetno stimulacijo sekrecije gonadotropinov (angl. *flare-up efekt*) in prehodni porast sinteze E2. Po dveh tednih od začetka aplikacij sledi podaljšana inhibicija sekrecije gonadotropinov in posledično padec E2. Po končani terapiji z agonisti GnRH pričakujemo ponovno povrnitev fizioloških mehanizmov izločanja gonadotropinov iz hipofize v 90 dneh.

Agonisti GnRH zavirajo sekrecijo in sintezo endogenih gonadotropinov ter s tem onemogočijo prezgodnje sproščanje LH med uporabo eksogenih gonadotropinov

Apliciramo jih vsak dan subkutano ali intranazalno. Depojski preparat, ki ima učinek približno 28 dni, je tudi dostopen, vendar lahko povzroči močnejšo zavoro, kot je potrebno, ustvari potrebo po večjem odmerku gonadotropinov in podaljša čas stimulacije z gonadotropini. Verjetno so odmerki agonistov, ki se danes uporabljajo, večji, kot je potrebno za izpolnitev temeljne indikacije, to je preprečevanje neželenega izločanja LH. Raziskav, ki bi opredeljevale minimalen, še učinkovit odmerek agonista GnRH, ni.

Pri uporabi agonistov GnRH je stopnja nosečnosti pomembno višja kot v ciklusih, stimuliranih le z gonadotropini (32). Po najpogosteje uporabljeni shemi se terapija z agonisti GnRH prične v srednji lutealni fazi (enaindvajseti ali dvaindvajseti dan v osemindvajsetdnevem ciklusu), kar označujemo kot »dolgi protokol«, ali pa se prične v zgodnji folikularni fazi (od drugega dne ciklusa) skupaj z gonadotropini, kar označujemo kot »kratki protokol«. V obeh primerih lahko uporabljamo ves čas enak odmerek agonistov GnRH do dne aplikacije HCG. Pri ženskah, ki so na standardne odmerke agonistov GnRH slabo odzivne, zmanjšanje odmerka na polovico ali pa predčasna prekinitve terapije z agonisti (po petih dneh stimulacije z gonadotropini) izboljšata odzivnost in rezultate (36, 37). Ko želimo uporabiti le lastnost agonistov GnRH, da v prvih dneh aplikacije dodatno povečajo

nivo FSH v krvi z izpraznitvijo depoja gonadotropinov v hipofizi (t. i. efekt agonistov *flare up*), se odločamo za »ultrakratki protokol«. Pri njem v začetku NOH injiciramo agonist le v prvi polovici folikularne faze ciklusa.

Primerjava kratkega in dolgega protokola je pokazala, da je indukcija ovulacije po dolgem protokolu uspešnejša, ker dobimo večjo kohorto foliklov enake velikosti in zato tudi več jajčnih celic, višjo stopnjo fertilizacije, višjo stopnjo nosečnosti in nižjo stopnjo izključitev iz postopka NOH (38).

Ženske, ki potrebujejo daljše obdobje uporabe agonistov GnRH za ustrezno supresijo hipofize, in tiste, ki razvijejo ciste na jajčniku, bodo bolj verjetno slabo odzivne na stimulacijo z gonadotropini, zaradi česar je uspeh postopka manj verjeten (39, 40).

Glede na začetni odmerek gonadotropinov sta v uporabi dva protokola. Protokol »step up« se prične z nizkim odmerkom gonadotropinov, ki ga povečujemo glede na odziv, pri protokolu »step down« pa pričnemo z visokim odmerkom gonadotropinov in ga postopno zmanjšujemo (41). Drugi protokol je popularnejši zlasti pri bolnicah s sindromom policističnih jajčnikov, z zvečanimi koncentracijami LH in zgodnjimi spontanimi splavi.

ANTAGONISTI GnRH IN EKSOGENI GONADOTROPINI

Antagonisti GnRH zavrejo izločanje gonadotropinov iz hipofize že v prvih 6 urah po aplikaciji. Razpolovni čas učinkovine je okoli 30 ur. Supresija FSH, LH in estradiola je konstantna ves čas aplikacije oziroma terapije.

Nimajo zaviralnega učinka na stimulacijo z gonadotropini, kar omogoča uporabo manjših odmerkov in krajše obdobje stimulacije z gonadotropini (42). Antagonisti GnRH imajo kar nekaj prednosti pred agonisti. Zaradi svojega takojšnjega delovanja se uporabljajo v kasnejši fazi stimulacije z gonadotropini, ko se je selekcija sekundarnih foliklov iz primarne kohorte foliklov že začela.

Antagoniste GnRH dajemo subkutano v zaporednih majhnih odmerkih (0,25 mg dnevno), z začetkom peti ali šesti dan stimulacije z gonadotropini (»fiksni protokol«) ali glede na individualni odziv, ko vodilni folikel doseže velikost 13–14 mm v premeru (»flek-

sibilni protokol»). Enkratni odmerek (3 mg *cetrorelīxa*) je učinkovit pri 75–90% žensk, pri tistih, ki v 90 urah po aplikaciji antagonista GnRH ne dosežejo kriterijev za dodajanje HCG, pa je potreben vsakodnevni odmerek 0,25 mg, dokler folikli ne dosežejo kriterijev za aplikacijo HCG (45–47).

Ko so izpolnjeni pogoji, ki opredeljujejo značilnosti predovulacijskih foliklov, je indicirana uporaba HCG v odmerku 5000–10000 IE. Enako je učinkovita tudi ekvivalentna doza rekombinantnega HCG, in sicer 250 µg (51, 52). HCG ima biološko učinkovitost naravnega LH in spodbudi proces končne zoritve jajčne celice (48).

Primerjava učinkov in uporabe agonistov ter antagonistov razkrije, da agonisti zavirajo in desenzibilizirajo receptorje GnRH, antagonisti pa delujejo na principu tekmovanja za receptorje GnRH. Antagonisti zavirajo sproščanje LH takoj, agonisti pa po začetnem porastu (*flare-up* učinek) (33). Prednost antagonistov pred agonisti je krajši čas stimulacije, potreba po nižjih odmerkih gonadotropinov in manjša verjetnost za pojav hiperstimulacije jajčnikov (34). Vendar pa je stopnja nosečnosti pri antagonistih nižja kot pri uporabi agonistov, kar je najpogosteje posledica neugodne selekcije pacientk za to vrsto stimulacije (takrat, ko druge oblike odpovedo). Vpliv ima tudi krivulja učenja dela z antagonisti kakor tudi možni neugodni učinki antagonistov na kakovost in receptivnost endometrija (34, 35).

NADZOR STIMULIRANIH CIKLUSOV

Odziv na stimulacijo jajčnikov spremljamo z merjenjem serumskega estradiola in uporabo transvaginalnega ultrazvoka za merjenje premera jajčnih foliklov in oceno dinamike razvoja ehografskega videza ter debeline endometrija.

Postopek nadzora mora biti prilagojen posameznici, upoštevati pa mora:

- prilagoditev protokolov časovnim obveznostim pacientke,
- redno preverjanje, če je odmerek gonadotropinov ustrezen,
- časovno optimiziranje aplikacije HCG,

- izogibanje razvoju hiperstimulacije jajčnikov,
- zmanjšanje možnosti za nastanek večplodnih nosečnosti,
- ekonomičnost pri uporabi zdravil in
- napredek na področju laboratorijskih tehnik reproduktivne biologije.

Shoham s sodelavci je postavil vprašanje, ali je mogoče uspešno nadzorovati indukcijo ovulacije le z ultrazvokom (UZ) (53). Rezultati njegove prospektivne raziskave so pokazali, da je sledenje z rednim nadzorom z UZ varno in zelo učinkovito. Takšen način spremljanja NOH je tudi pacientkam prijaznejši, zato se je ehografsko spremljanje razvoja foliklov danes uveljavilo in je popolnoma nadomestilo vsakodnevno spremljanje (tudi nekajkrat dnevno) hormonskih parametrov (54). Takšno spremljanje je ostalo pomembno le ob sumu na hiperstimulacijo jajčnika, ko priporočajo kontrolo estradiola. Tudi druge raziskave so potrdile, da je nadzor z UZ dober način kontrole zorenja foliklov in endometrija ter ocene optimalnega časa dodatka HCG, da se ne zniža stopnja nosečnosti in se ne poveča verjetnost za hiperstimulacijo jajčnika (57, 58).

Med stimulacijo se rast endometrija spremlja z merjenjem debeline endometrija in ehografskega izgleda endometrija. O vplivu debeline in ehogenosti endometrija na izid postopkov asistirane reprodukcije je bilo opravljenih veliko raziskav. Pokazale so, da so rezultati najboljši, ko je debelina endometrija od 8 do 9 mm in izgled trislojen. Slabo prognozo za izid postopka prenosa zarodkov pri OBMP pa ima endometrij, ki je tanjši od 6 do 7 mm in ima homogen hiperehogen izgled na dan dodatka HCG (53, 57, 58). V drugih raziskavah pa niso ugotovili pomembnejše povezave med debelino endometrija in izidom postopkov (59–61). Zato je sprememba stimulacije ali prekinitve ciklusa težko utemeljiti le na podlagi debeline in izgleda endometrija (62).

PROTOKOLI PRI SLABO ODZIVNIH JAJČNIKI

Kot slab odziv jajčnikov na stimulacijo z gonadotropini označujemo, če se ob ustreznih stimulaciji jajčnikov razvijejo le trije ali manj

foliklov premera 16 mm, le en dominanten folikel ali če so bili v preteklosti ciklusi stimulacije prekinjeni zaradi manj kot treh razvijajočih se foliklov.

Za nadaljevanje postopkov stimulacije pri teh pacientkah v literaturi zasledimo več predlogov:

- dolgi protokol z večjimi dnevnimi odmerki gonadotropinov (63),
- zmanjševanje odmerkov agonistov GnRH ali prekinitev aplikacije le-teh takoj ali kmalu po začetku stimulacije z gonadotropini (64),
- kratkotrajna uporaba agonistov GnRH v folikularni fazi (65),
- sekvencijska uporaba CC in eksogenih gonadotropinov.

ZAKLJUČEK

Pri obravnavi neplodnosti so se v zadnjih petdesetih letih zgodile revolucionarne spremembe in razvoj. Z uporabo humanih hipo-

fiznih gonadotropinov leta 1958 se je začelo obdobje razvoja pripravkov za indukcijo ovulacije in že leta 1970 sta Lunenfeld in Insler s sodelavci poročala o uporabi humanih gonadotropinov, pridobljenih iz urina pomenopavznih žensk (66–68). V istem obdobju so izolirali in identificirali tudi GnRH. To so bili temelji za kasnejši razvoj različnih protokolov stimulacije ovarija, ki vključujejo uporabo različnih kombinacij gonadotropinov, analogov GnRH in tudi CC (Greenblat in sodelavci leta 1961).

Smernice za sedanjost dobro klinično prakso na področju indukcije ovulacije in celostnega pristopa k zdravljenju neplodnosti je sprejelo Evropsko združenje za humano reprodukcijo in endokrinologijo (ESHRE). V njih priporočajo manj agresivne metode indukcije ovulacije ter individualen, učinkovit, prijazen in čim cenejši načrt obravnave (70). Sicer Slovenija med članicami EU velja za državo z zgleđno urejenim področjem zdravljenja neplodnosti z metodami OBMP (71).

LITERATURA

1. Speroff L, Fritz MA. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
2. Rongières-Bertrand C, Olivennes F, Righini C, et al. Revival of the natural cycles in in-vitro fertilization with the use of a new gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix): a pilot study with minimal stimulation. *Hum Reprod.* 1999; 14: 683–8.
3. Vlaisavljević V, Kovačič B, Gavrić V. In vitro fertilization program based on programmed cycles monitored by ultrasound only. *Int J Gynecol Obstet.* 1992; 39: 227–31.
4. Vlaisavljević V, Kovačič B, Gavrić Lovrec V, et al. Simplification of the clinical phase of IVF and ICSI treatment in programmed cycles. *Int J Gynecol Obstet.* 2000; 69:135–42.
5. Tomažević T, Geršak K, Meden-Vrtovec H, et al. Second versus fourth day embryo transfer in the natural IVF cycle. *Hum Reprod.* 1996; 11 (1): 87–8.
6. Meden-Vrtovec H, Tomažević T. Severe ovarian hyperstimulation syndrome in the IVF-ET program. *Assist Reprod Technol Androl.* 1992; 3: 344–53.
7. Foulot H, Ranoux C, Dubuisson JB, et al. In vitro fertilization without ovarian stimulation: a simplified protocol applied in 80 cycles. *Fertil Steril.* 1989; 52: 617–21.
8. Pelinck MJ, Hoek A, Simons AH, et al. Efficacy of natural cycle IVF: a review of the literature. *Hum Reprod Update.* 2002; 8: 129–39.
9. Matsuura T, Takehara Y, Kaijima H, et al. Natural IVF cycles may be desirable for women with repeated failures by stimulated IVF cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2008; 25: 163–7.
10. Ng EH, Chui DK, Tang OS, et al. In vitro fertilization and embryo transfer during natural cycles. *J Reprod Med.* 2001; 46: 95–9.
11. Tomažević T, Geršak K, Meden-Vrtovec H, et al. Clinical parameters to predict the success of in vitro fertilization-embryo transfer in the natural cycle. *Assist Reprod.* 1999; 9: 149–56.
12. Tomažević T, Korošec S, Virant Klun I, et al. Age, oestradiol and blastocysts can predict success in natural cycle IVF-embryo transfer. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15: 220–6.
13. Edwards RG. IVF, IVM, natural cycle IVF, minimal stimulation IVF-time for a rethink. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15: 106–19.

14. Vlaisavljević V, Kovačić B, Reljić M, et al. Three protocols for monitoring follicle development in 587 unstimulated cycles of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. A comparison. *J Reprod Med.* 2001; 46: 892–8.
15. Vlaisavljević V, Kovačić B, Reljić M, et al. Is there any benefit from the culture of a single oocyte to a blastocyst-stage embryo in unstimulated cycles? *Hum Reprod.* 2001; 16: 101–5.
16. Vlaisavljević V, Kovacic B, Reljić M, et al. Results of ICSI of single oocyte in 363 unstimulated cycles. *J Assist Reprod Genetics.* 2002; 19: 127–31.
17. Vlaisavljević V. Embryo transfer and luteal support in natural cycles. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14: 686–92.
18. Wu CH, Winkel CA. The effect of therapy initiation day on clomiphene citrate therapy. *Fertil Steril.* 1989; 52: 564–8.
19. Ingerslev HJ, Højgaard A, Hindkjaer J, et al. A randomized study comparing IVF in the unstimulated cycle with IVF following clomiphene citrate. *Hum Reprod.* 2001; 16: 696–702.
20. Poulsen PB, Ingerslev HJ, Larsen DD, et al. Cost-effectiveness analysis of in-vitro fertilization treatments. *Annu Meet Int Soc Technol Assess Health Care.* 1999; 15: 51–6.
21. Awonuga AO, Nabi A. In vitro fertilization with low-dose clomiphene citrate stimulation in women who respond poorly to superovulation. *J Assist Reprod Genet.* 1997; 14: 503–7.
22. Engel JB, Ludwig M, Felberbaum R, et al. Use of cetrorelix in combination with clomiphene citrate and gonadotrophins: a suitable approach to 'friendly IVF'? *Hum Reprod.* 2002; 17: 2022–6.
23. 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: 305–9.
24. Tulandi T, Martin J, Al-Fadhli R, et al. Congenital malformations among 911 newborns conceived after infertility treatment with letrozole or clomiphene citrate. *Fertil Steril.* 2006; 85: 1761–5.
25. Tehrani Nejad ShE, Abediasl Z, Rashidi BH, et al. Comparison of the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole and clomiphene citrate gonadotropins in controlled ovarian hyperstimulation: a prospective, simply randomized, clinical trial. *J Assist Reprod Genet.* 2008; 25: 187–90.
26. Healey S, Tan SL, Tulandi T, et al. Effects of letrozole on superovulation with gonadotropins in women undergoing intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 2003; 80: 1325–9.
27. European and Israeli Study Group on Highly Purified Menotropin versus Recombinant Follicle-Stimulating Hormone. Efficacy and safety of highly purified menotropin versus recombinant follicle-stimulating hormone in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles: a randomized, comparative trial. *Fertil Steril.* 2002; 78: 520–8.
28. Meden-Vrtovec H, Močnik-Rožnik S, Tomažević T, et al. Recombinant FSH vs. urinary FSH for ovarian stimulation in in vitro fertilization. *J Reprod Med.* 2003; 48: 799–803.
29. Yarali H, Bukulmez O, Gurgan T. Urinary follicle-stimulating hormone (FSH) versus recombinant FSH in clomiphene citrate-resistant, normogonadotropic, chronic anovulation: a prospective randomized study. *Fertil Steril.* 1999; 72: 276–81.
30. Bayram N, van Wely M, van Der Veen F. Recombinant FSH versus urinary gonadotrophins or recombinant FSH for ovulation induction in subfertility associated with polycystic ovary syndrome : a systematic review based on a Cochrane review. *Hum Reprod.* 2003; 18: 1143–9.
31. Medved R, Korošec S, Virant I, et al. Spodbujanje ovulacije v postopku IVF-ET. *Zdrav Vestn.* 2002; 71: 177–80.
32. Daya S. Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000; (1): CD001299.
33. 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: 644–51.
34. Fluker M, Grifo J, Leader A, et al. North American Ganirelix Study Group. Efficacy and safety of ganirelix acetate versus leuprolide acetate in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril.* 2001; 75: 38–45.
35. Hernandez ER. Embryo implantation and GnRH antagonists: embryo implantation: the Rubicon for GnRH antagonists. *Hum Reprod.* 2000; 15: 1211–6.
36. Albano C, Felberbaum RE, Smitz J, et al. Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetrorelix and the LHRH-agonist buserelin. *European Cetrorelix Study Group. Hum Reprod.* 2000; 15: 526–31.
37. Feldberg D, Farhi J, Ashkenazi J, et al. Minidose gonadotropin-releasing hormone agonist is the treatment of choice in poor responders with high follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril.* 1994; 62: 343–6.
38. Tavmergen E, Göker EN, Sendag F, et al. Comparison of short and long ovulation induction protocols used in ART applications according to the ovarian response and outcome of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet.* 2002; 266: 5–11.
39. Pinkas H, Orvieto R, Avrech OM, et al. Gonadotropin stimulation following GnRH-a priming for poor responders in in vitro fertilization-embryo transfer programs. *Gynecol Endocrinol.* 2000; 14: 11–4.
40. Thatcher SS, Jones E, DeCherney AH. Ovarian cysts decrease the success of controlled ovarian stimulation and in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1989; 52: 812–6.

41. Meldrum DR, Wisot A, Hamilton F, et al. Timing of initiation and dose schedule of leuprolide influence the time course of ovarian suppression. *Fertil Steril.* 1988; 50: 400-2.
42. Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K. Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproductive technologies compared to the long protocol. Meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2001; 265: 175-82.
43. Orvieto R, Meltzer S, Rabinson J, et al. GnRH agonist versus GnRH antagonist in ovarian stimulation: the role of endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2008; 90: 1294-6.
44. Al-Inany H, Aboulghar M. GnRH antagonist in assisted reproduction: a Cochrane review. *Hum Reprod.* 2002; 17: 874-85.
45. Klipstein S, Reindollar RH, Regan MM, et al. Initiation of the gonadotropin-releasing hormone antagonist ganirelix for in vitro fertilization cycles in which the lead follicle is >14 mm. *Fertil Steril.* 2004; 81: 714-5.
46. Olivennes F, Alvarez S, Bouchard P, et al. The use of a GnRH antagonist (Cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 versus 2 mg. *Hum Reprod.* 1998; 13: 2411-4.
47. Olivennes F, Diedrich K, Frydman R, et al. Cerotide Multiple Dose International Study Group; Cerotide Single Dose International Study Group. Safety and efficacy of a 3 mg dose of the GnRH antagonist cetrorelix in preventing premature LH surges: report of two large multicentre, multinational, phase IIIb clinical experiences. *Reprod Biomed Online.* 2003; 6: 432-8.
48. Vlaisavljević V, Reljić M, Lovrec Gavrić V, et al. Comparable effectiveness using flexible single-dose GnRH antagonist (cetrorelix) and single-dose long acting GnRH agonist (goserelin) protocol for IVF cycles – a prospective, randomized study. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7: 301-8.
49. Kolibianakis EM, Albano C, Camus M, et al. Relationship between LH and oestradiol in IVF cycles before GnRH antagonist initiation. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7: 190-3.
50. Kolibianakis EM, Albano C, Kahn J, et al. Exposure to high levels of luteinizing hormone and estradiol in the early follicular phase of gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles is associated with a reduced chance of pregnancy. *Fertil Steril.* 2003; 79: 873-80.
51. Ludwig M, Doody KJ, Doody KM. Use of recombinant human chorionic gonadotropin in ovulation induction. *Fertil Steril.* 2003; 79:1051-9.
52. Butler SA. HCG-mass units, molar conversions, and the standardization of biologic units. *Fertil Steril.* 2003; 80: 1533; author reply 1533-4.
53. Shoham Z, Di Carlo C, Patel A, et al. Is it possible to run a successful ovulation induction program based solely on ultrasound monitoring? The importance of endometrial measurements. *Fertil Steril.* 1991; 56: 836-41.
54. Vlaisavljević V, Dmitrović R, Sajko MC. Should practice of double blastocyst transfer be abandoned? A retrospective analysis. *Reprod Biomed Online.* 2008; 16: 477-83.
55. Kovačić B, Vlaisavljević V. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2008; 17: 229-36.
56. Kovačić B, Vlaisavljević V. Oploditev in nepravilnosti oploditve po vnosu semenčice v jajčno celico. *Med Razgl.* 2001; 40: 95-105.
57. Shoham Z. The clinical therapeutic window for luteinizing hormone in controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril.* 2002; 77: 1170-7.
58. Fanchin R, Righini C, Ayoubi JM, et al. New look at endometrial echogenicity: objective computer-assisted measurements predict endometrial receptivity in in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 2000; 74: 274-81.
59. Bassil S. Changes in endometrial thickness, width, length and pattern in predicting pregnancy outcome during ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001; 18: 258-63.
60. Weissman A, Gotlieb L, Casper RF. The detrimental effect of increased endometrial thickness on implantation and pregnancy rates and outcome in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril.* 1999; 71: 147-9.
61. Dietterich C, Check JH, Choe JK, et al. Increased endometrial thickness on the day of human chorionic gonadotropin injection does not adversely affect pregnancy or implantation rates following in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 2002; 77: 781-6.
62. De Geyter C, Schmitter M, De Geyter M, et al. Prospective evaluation of the ultrasound appearance of the endometrium in a cohort of 1,186 infertile women. *Fertil Steril.* 2000; 73: 106-13.
63. Stadtmayer L, Ditkoff EC, Session D, et al. High dosages of gonadotropins are associated with poor pregnancy outcomes after in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 1994; 61: 1058-64.
64. Padilla SL, Dugan K, Maruschak V, et al. Use of the flare-up protocol with high dose human follicle stimulating hormone and human menopausal gonadotropins for in vitro fertilization in poor responders. *Fertil Steril.* 1996; 65: 796-9.
65. Benadiva CA, Davis O, Kligman I, et al. Clomiphene citrate and hMG: an alternative stimulation protocol for selected failed in vitro fertilization patients. *J Assist Reprod Genet.* 1995; 12: 8-12.
66. Gemzell CA, Diczfalusy E, Tillinger G. Clinical effect of human pituitary follicle-stimulating hormone (FSH). *J Clin Endocrinol Metab.* 1958; 18: 1333-48.

67. Lunenfeld B, Insler V, Rabau E. Die Prinzipien der Gonadotropin Therapie. *Acta Endocrinol.* 1970; 65: S52-101.
68. Insler V, Rabau E, Lunenfeld B. Comparison of ovarian response to different treatment schedules of human gonadotrophins. In: Butler JK, ed. *Developments in the pharmacology and clinical uses of human gonadotrophins.* High Wycombe, England: GD Searle; 1970. p. 87-100.
69. Greenblatt RB, Barfield WE, Jungck EC, et al. Ray AW. Induction of ovulation with MRL/41. Preliminary report. *JAMA.* 1961; 178: 101-4.
70. Vlaisavljevič V. Dobra klinička praksa u potpomognutoj reprodukciji. Izvješće ESHRE – Lipanj 2008. *Gynaecol Perinatol.* 2008; 17: 237-40.
71. Vlaisavljevič V. Slovenia extends its state support of IVF. *Focus on Reproduction.* 2008; 10-1.

Prispelo 19. 6. 2009