

Pregledni prispevek/Review article

OD KONVENCIONALNIH K ZMERNEJŠIM OBLIKAM SPODBUJANJA JAJČNIKOV V POSTOPKU ZUNAJTELESNE OPLODITVE

FROM THE CONVENTIONAL TO THE Milder APPROACHES TO OVARIAN
STIMULATION FOR IN VITRO FERTILIZATION

Eda Vrtačnik-Bokal

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šlajmerjeva 3, 1000 Ljubljana

Izvleček

- Izhodišča** *Zunajtelesno oploditev (ZTO) opravljamo z jajčnimi celicami, ki jih pridobimo v naravnih in spodbujenih ciklih. Po svetu se uporabljajo različni pristopi pri spodbujanju jajčnikov. Po uvedbi antagonistov gonadoliberinov in strategij za zmanjševanje mnogoplovnih nosečnosti z uvajanjem selektivnega prenosa enega zarodka, se je spet povrnilo zanimanje za oživitve naravnega postopka in zmernega spodbujanja v postopkih ZTO. Namen zmernega spodbujanja jajčnikov je doseči učinkovitost vložka in uvesti bolnicam prijazno obravnavanje, s katerim bi dosegli uravnoteženost med izhodom in tveganji zdravljenja.*
- Metode** *Podatke o naravnih, modificiranih naravnih, zmernih in konvencionalnih postopkih ZTO smo iskali v Pubmedu do leta 2009.*
- Rezultati** *Podatki, ki smo jih obravnavali v tem preglednem članku, ne omogočajo, da bi lahko priporočili, kateri protokol zmernega spodbujanja je najbolj primeren. Vsekakor pa je jasno, da je prav uvedba antagonistov gonadoliberinov v klinično prakso omogočila tudi zmernejše oblike spodbujanja pri ZTO zaradi sposobnosti preprečevanja prezgodnjega vrha luteinizirajočega hormona (LH) s kompetitivno blokado receptorjev gonadoliberinov. Študije prav tako kažejo, da zmerno vnašanje gonadotropinov v sredini folikularne faze, ko se serumska koncentracija folikel stimulirajočega hormona (FSH) zniža, zadostuje za preprečitev selekcije enega samega dominantnega folikla, hkrati pa pospeši rast ostalih zrelih foliklov, ki so senzibilizirani na FSH s posledično odzivnostjo na LH.*
- Zaključki** *Uvajanje zmernega spodbujanja in modificiranega naravnega ciklusa v standardno klinično prakso izgleda upravičeno, potrebne pa so dodatne prospektivne raziskave, da bi našli najprimernejši način zmernega spodbujanja.*
- Ključne besede** *zunajtelesna oploditev; modificirani naravni postopek; zmerno spodbujanje jajčnikov; konvencionalno spodbujanje jajčnikov*

Abstract

- Background** *In-vitro fertilization (IVF) is performed with oocytes collected in natural and stimulated cycles. Different approaches to ovarian stimulation have been employed worldwide. Following the introduction of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) antagonists and strategies to reduce multiple birth such as single embryo transfer, there is an interest in the revival of natural and mild approaches to ovarian stimulation in IVF. Particular mild ovarian stimulation aims to achieve cost-effective, patient-friendly regimens which optimize the balance between outcomes and risks of treatment.*
- Methods** *Pubmed was searched up to 2009 for papers on natural, modified natural, mild and conventional IVF cycles.*
- Results** *Data discussed in this review do not allow any conclusions to be drawn regarding the most optimal mild ovarian stimulation protocol. However, it is absolutely clear that introduc-*

tion of GnRH antagonists into clinical practice has allowed for the introduction of milder stimulation approaches for IVF treatment because of preventing premature luteinising hormone (LH) rise by competitive blockade of the GnRH receptors. Studies also show that mild exogenous gonadotrophins interference with the decrease in follicle-stimulating hormone ((FSH) levels in the mid-follicular phase was sufficient to override the selection of a single dominant follicle and enhance the most mature follicles to growth due to their increased sensitivity for FSH and acquired responsiveness to LH.

Conclusions *The implementation of mild stimulation and modified natural cycle into standard clinical practise appears to be justified, although more prospective studies are needed to find the most appropriate mild stimulation approaches.*

Key words *in vitro fertilization; modified natural cycle; mild in-vitro fertilization; conventional in-vitro fertilization*

Uvod

Spodbujanje jajčnikov z gonadotropini je pomemben del postopka zunajtelesne oploditve (ZTO). Čeprav je bil prvi uspešni postopek rojstvo Luise Brown leta 1978 posledica aspiriranja folikla v nespozbujenem menstruacijskem ciklusu,¹ je bila v zadnjih 25 letih pozornost usmerjena v različne protokole z namenom, da bi pridobili več jajčnih celic in zarodkov in s tem zvišali stopnjo nosečnosti. Ta način spodbujanja jajčnikov je dobil dodaten pomen z uvedbo zamrzovanja nadštevilnih zarodkov in vračanja v naslednjih menstruacijskih ciklikih. Trenutno najbolj pogosto izvajamo dolg protokol spodbujanja jajčnikov s kombinacijo agonistov gonadoliberinov in sorazmerno visokih odmerkov gonadotropinov, od 150 do 450 IU dnevno.² Ti protokoli spodbujanja jajčnikov imajo številne slabosti. So dragi, trajajo dolgo in so za bolnice obremenjujoči zaradi ponavljajočega se vnašanja zdravil in številnih obiskov, ki so potrebni za nadzorovanje samega postopka. Največja slabost klasičnih protokolov pa je večja možnost, da se razvije sindrom čezmernega odziva jajčnikov, ki je resna bolezen za žensko in se lahko konča tudi s smrtjo.³ Prav tako je velik problem shranjevanje nadštevilnih zarodkov, ki se jim pari odrečejo in jih ne želijo uporabiti.

Možni pomisleki glede uvajanja modificiranih spontanov postopkov ZTO in postopkov z zmernim spodbujanjem jajčnikov temeljijo predvsem na bojazni, da bi se znižala stopnja nosečnosti. Vendar je v današnjem času veliko več znanja tako na področju spodbujanja jajčnikov, predvsem v kombinaciji gonadotropinov z antagonisti gonadoliberinov, ki učinkovito zavirajo nastanek prezgodnjega vrha luteinizirajočega hormona (LH)⁴ kot na področju laboratorijskih tehnik. Torej so prednosti zmernega spodbujanja dobro definirane in opravičujejo vključitev v programe ZTO.

Terminologija spodbujanja jajčnikov v postopku zunajtelesne oploditve⁵

Glede na številne strokovne publikacije, v katerih uporabljajo različno terminologijo, in glede na ponovno oživitve spontanega in zmerno spodbujenega postopka v klinično prakso, se je izkazalo za potrebno, da se

ta terminologija na novo opredeli in poenoti. Skupina strokovnjakov iz International Society for Mild Approaches in Assisted Reproduction (ISMAAR) je pregledala razpoložljivo literaturo in sprejela novo terminologijo, ki je razvidna iz Tabele 1.

Tab. 1. Terminologija postopkov zunajtelesne oploditve.

Table 1. Terminology of in-vitro fertilization cycles.

Priporočljiva terminologija Recommended terminology	Zamenjana terminologija Replaced terminology
Naravni postopek ZTO Natural cycle IVF	Nespozbujen, spontan postopek ZTO Unstimulated, spontaneous cycle IVF
Modificiran naravni postopek ZTO Modified natural cycle IVF	Polovično naraven, kontrolirano naraven postopek ZTO Semi-natural, controlled natural cycle IVF
Zmerna oblika ZTO	Mehko, minimalno spodbujanje, prijazna ZTO
Mild IVF	Soft, minimal stimulation, »friendly« IVF
Konvencionalna oblika ZTO Conventional IVF	Standardna, rutinska ZTO, kontrolirano spodbujanje jajčnikov ZTO Standard, routine IVF, controlled ovarian stimulation IVF

Kratek opis različnih pristopov ZTO

Naravni postopek ZTO

Naravni postopek ZTO je postopek, pri katerem ne uporabljamo nobenih zdravil in zasledujemo naravni menstruacijski cikel s pomočjo ultrazvoka, serumske koncentracije estradiola in urinskega LH z namenom, da pridobimo eno samo jajčno celico. Slabost omenjenega pristopa je, da veliko postopkov odpade. Prav tako s tem postopkom ne dosegamo primerne stopnje nosečnosti, zato se praktično ne uporablja.⁶

Modificiran naravni postopek ZTO

To je najpogosteje uporabljena metoda naravnega postopka ZTO. Uporabljamo ga pri ženskah, ki ne želijo vnašati hormonov, da bi pridobile več jajčnih celic.⁷ Prav tako nekateri avtorji priporočajo omenjeni protokol za ženske, ki se slabo odzivajo na spodbujanje z gonadotropini.⁸⁻¹⁰ Postopek, ki ga izvajamo med spontanem menstruacijskim ciklusom, nadzorujemo

s ponavljajočimi se ultrazvočnimi preiskavami in/ali s serumskimi koncentracijami estradiola in LH. V območju optimalnih koncentracij estradiola in LH ter ultrazvočne meritve folikla in endometrija dnevno vnašamo antagonist gonadoliberinov vse do vnosa humanega horionskega gonadotropina (HCG) za zorenje jajčne celice. Hkrati z antagonist gonadoliberinov lahko vnašamo tudi gonadotropine v nizkih odmerkih (do 150 IE na dan) kot podporno zdravljenje zaradi padca FSH in za vzdrževanje folikla.¹¹ Pri tem postopku je potrebna lutealna podpora s HCG ali progesteronom.

Tudi pri tem postopku, če ne uporabimo antagonist gonadoliberinov, odpade veliko število začelih postopkov. Na Ginekološki kliniki v Ljubljani je Tomažević uvedel protokol, po katerem se HCG za zorenje jajčnih celic vnaša sorazmerno zgodaj v folikularni fazi, ko dominantni folikel meri 16 mm in več v premeru in ko je pripadajoča serumska koncentracija estradiola > 0.49 nmol/L ob odsotnosti vrha LH.^{12,13} Na ta način se je zmanjšalo število prekinjenih postopkov, kar je kasneje potrdila tudi mariborska skupina IVF.¹⁴ Problem pa še vedno ostaja v nizki stopnji nosečnosti. Nadaljnje raziskave ljubljanske skupine¹⁵⁻¹⁷ so nazorno pokazale, da je kakovost jajčnih celic in zgodnjih zarodkov, pridobljena v modificiranih naravnih postopkih, v primerjavi s spodbujenimi postopki popolnoma enaka. Torej je problem po vsej verjetnosti v vsaditvi. Ugotovili smo, da kljub zgodnjemu vnašanju HCG nismo preprečili nastanka vrha LH, ki je nastopil v času aspiriranja folikla. Predvidevamo, da je do spontanega vrha LH prišlo zaradi predhodne senzibilizacije dominantnega folikla na FSH in LH, ki je neovirano tekla dalje. Po vsej verjetnosti pa je vnos HCG in kasneje spontani vrh LH negativno vplival na strukturo endometrija in posledično na slabo vgnezdenje.

Zmerna ZTO

Zmerna ZTO je metoda, pri kateri gonadotropine vnašamo v nizkih odmerkih in ali krajše obdobje v postopkih, kjer sočasno uporabljamo antagonist gonadoliberinov ali ko uporabljamo oralne učinkovine (anti-estrogene, aromatazne inhibitorje) same ali v kombinaciji z gonadotropini. Za zorenje jajčnih celic vnašamo HCG, za lutealno podporo pa HCG ali progesteron. Pri zmerni ZTO pridobimo od 2-7 jajčnih celic.¹⁸ V prihodnosti pričakujemo večje izvajanje omejenega protokola ali pa bo popolnoma nadomestil konvencionalne protokole, seveda ob dejstvu, da je samo rojstvo enojčka uspešen izid ZTO.

Konvencionalna ZTO

Ta protokol uporabljamo najpogosteje. Agoniste gonadoliberinov vnašamo v dolgih ali kratkih protokolih s konvencionalnimi odmerki gonadotropinov za spodbujanje jajčnikov. Med konvencionalne postopke sodijo tudi postopki z antagonist gonadoliberinov s konvencionalnimi odmerki gonadotropinov od 2. dneva menstruacijskega ciklusa dalje.² Celotni odmerek gonadotropinov na postopek je višji, prav tako trajanje spodbujanja v primerjavi z zmernim spodbujanjem.¹⁸

Fiziološka utemeljitev protokola zmerne ZTO

Uvedna antagonistov gonadoliberinov v klinično prakso je omogočila, da poteka spodbujanje jajčnikov bolj fiziološko v aktualnem menstruacijskem ciklusu. Prav to pa je temelj za izvajanje zmerne ZTO.

V vsakem ciklusu se v povprečju rekrutira 11 foliklov v vsakem jajčniku. Število je zelo odvisno od starosti bolnice.¹⁹ Znano je, da je folikel stimulirajoči hormon (FSH) tisti dejavnik, ki vpliva na preživetje antralnih foliklov. V zgodnji folikularni fazi FSH rahlo narašča in doseže plato, nato pa prične padati v srednji in pozni folikularni fazi zaradi inhibicije B in negativne ovarijske steroidne zanke.²⁰ Kljub temu koncentracija FSH zadošča za vzdrževanje dominantnega folikla, prav tako pa tudi za rast zrelih foliklov zaradi pridobljene povečane občutljivosti na FSH in LH.²¹ Pri vseh ostalih rekrutiranih foliklih pa zaradi pomanjkanja spodbujanja s FSH pride do atrezije.²²

Ko smo dobili v uporabo gonadotropine, se je pričelo uvajanje spodbujanja jajčnikov z visokimi odmerki gonadotropinov znotraj cele folikularne faze, kar je imelo za posledico razvoj številnih dominantnih foliklov.²³ Študije na primatih so pokazale, da zmerno spodbujanje v času zniževanja FSH v sredini folikularne faze zadošča, da prepreči selekcijo dominantnega folikla.²⁴ Sedaj je ta koncept potrjen tudi pri človeku. Zmerno, vendar kontinuirano vnašanje gonadotropinov v času srednje in kasne folikularne faze zadošča, da se vmešajo v selekcijo in preprečijo rast samo enega folikla, spodbudijo pa nadaljnjo rast zrelih, na FSH senzibiliziranih foliklov.²⁵

Prednost zmerne spodbujanja je dokazana tudi na genetski ravni zgodnjih zarodkov. Pri zmerni ZTO v primerjavi s konvencionalnim dolgim protokolom agonistov gonadoliberinov v kombinaciji z gonadotropini so ugotovili, da so pridobili manj jajčnih celic in manj zarodkov, vendar je bila stopnja kromosomske normalnih zarodkov bistveno višja. Kljub večjemu številu jajčnih celic in zarodkov pri konvencionalni ZTO je bilo absolutno število kromosomske normalnih zarodkov v obeh skupinah na koncu popolnoma enako (1,8 zarodka), prav tako pa tudi stopnja nosečnosti.²⁶ Vsa navedena dejstva kažejo na to, da zmerna ZTO najmanj moti ovarijsko fiziologijo.

Izhodišča za uvedbo zmerne spodbujanja jajčnikov v Sloveniji

Zakaj je uvedba zmerne spodbujanja jajčnikov še posebno primerna za izvajanje v slovenskem programu postopkov ZTO. ZZZS povrne stroške zdravljenja za 6 postopkov za prvo nosečnost in nato še štiri za vsako nadaljnjo nosečnost.²⁷ Podatki iz literature kažejo, da je stopnja nosečnosti najvišja po prvem postopku, nato pa se s ponavljajočimi se postopki niža.^{28,29} Kljub temu, da po zmernemu spodbujanju jajčnikov odpade večje število bolnic za aspiriranje foliklov v primerjavi s konvencionalnimi protokoli, pa je kumulativna stopnja nosečnosti, s ponavljajočimi se postopki na koncu enaka.¹⁸ Tudi morebitni neuspeh v prvem in drugem postopku za par tako ne bi bil problematičen, saj bi v preostalih štirih postopkih še vedno lahko opravili konvencionalno spodbujanje jajčnikov. Vse skupaj pa po-

meni bistveno manjšo obremenitev za par v postopku, nižjo ceno postopka, predvsem pa pomembno varnejši postopek, kajti na ta način se praktično v celoti izognemo sindromu čezmernega odziva jajčnikov, ki je resen zaplet in se lahko konča tudi s smrtjo.

Drugi razlog za uvedbo zmerne spodbujanja jajčnikov je, da približno četrtine zamrznjenih zgodnjih zarodkov pari ne želijo uporabiti.³⁰ Zakon o zdravljenju neplodnosti in postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo (ZZNPOB) nalaga, da se neuporabljeni zgodnji zarodki hranijo toliko časa, kolikor želita ženska in moški, katerima se pomaga s postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo (OBMP), vendar ne več kot pet let. Iz zdravstveno utemeljenih razlogov se lahko z dovoljenjem Državne komisije za OBMP čas hranjenja podaljša za največ pet let. Podaljšanje lahko zahteva oseba, od katere zarodki izvirajo. Po preteku rokov je treba zgodnje zarodke zavreči.³¹

Naslednji razlog za uvedbo zmerne spodbujanja jajčnikov je ta, da je samo aspiriranje manjštevlnih foliklov bolj prijazno in manj boleče za bolnico, hkrati pa se tudi zmanjšuje možnost krvavitve, poškodbe sosednjih organov in vnetnih reakcij.

Predvidevamo, da bo uvedba zmerne protokola ZTO v slovenski prostor sorazmerno težavna in za tisti center, ki ga bo pričel uvajati, zelo tvegana. V nepretrganem prizadevanju za doseganje čimvišje stopnje nosečnosti na postopek se bo le-ta znižala, kajti filozofija zmerne spodbujanja je, da pridemo do zdravega otroka na najbolj varen način s ponavljajočimi se, varnimi postopki. Številni strokovnjaki vse bolj poudarjajo, kako nepomembna in celo moteča je markentiško, populistična in brezkompromisna tekma za doseganje in prikazovanje čim višje stopnje nosečnosti.³² Tako morajo neplodni pari, strokovnjaki in tudi država, ki plačuje postopke, zasledovati en in edini cilj: roditi se mora zdrav otrok. Z uvedbo zmerne spodbujanja in prenosa samo enega zarodka bi naredili pomemben korak k zmanjšanju števila dvojčkov in prezgodaj rojenih otrok in številu bolnic s sindromom čezmerno spodbujenih jajčnikov. Dolžnost strokovnjakov s področja neplodnosti pa je, da paru natančno obrazložijo, kakšen je njihov problem in podajo objektivno oceno glede njihovih pričakovanj. Uvajanje strategije zmerne ZTO bo povezano tako s skrbnim svetovanjem parom kot tudi izvajalcem ZTO. Prav tako naj bi pri tem uvajanju poleg strokovnjakov sodelovali tudi predstavniki zdravstvene politike, ki nadzorujejo izvajanje programov ZTO.

Zaključki

Odkritje in uvedba antagonistov gonadoliberinov v klinično prakso je omogočilo ponovno uvedbo naravnega modificiranega in zmerne postopka ZTO, kajti na ta način lahko odpravimo najpogostejši problem, to je nastanek spontanega vrha LH, kar je imelo za posledico prekinitev številnih postopkov. Kljub temu, da bo lahko na začetku stopnja nosečnosti na ciklus nižja v primerjavi s konvencionalnimi postopki ZTO, nas to ne bi smelo ustaviti, kajti kumulativna stopnja nosečnosti ob bistveno manjši porabi gonadotropinov bo enaka, približno 50 %, zagotovo pa bo manj

večplodnih nosečnosti in prezgodnjih porodov. Prav tako je to tudi pravi pristop k odpravljanju sindroma čezmernega spodbujanja jajčnikov, ki trenutno predstavlja resen problem pri uporabi gonadotropinov v visokih odmerkih. V Sloveniji smo naredili korak naprej z uvedbo selektivnega prenosa enega zarodka, ki ga je omogočila tudi ZZZS s povrnitvijo stroškov za 6 postopkov, in ne več samo za 4 postopke. Narediti je potrebno še naslednjega in uvesti zmerno spodbujanje v postopkih ZTO. Poleg vseh naštetih prednosti zmerne ZTO je tudi ta, da npr. v enem letu lahko naredimo 4 zmerne ali samo 3 konvencionalne ZTO za enak rezultat in z veliko manjšim angažiranjem para. Nenazadnje je pomembno tudi to, da par pride do otroka takrat, ko ga planira. Eno leto je tisto obdobje, ki je sprejemljivo, da vsaj polovico parov pride do rezultata.

Literatura

1. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the preimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2: 366.
2. Maclon NS, Stouffer RL, Giudice LC, Fauser BC. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocrinol Rev* 2006; 27: 170-207.
3. Aboulghar MA, Mansour RT. Ovarian hyperstimulation syndrome: classifications and critical analysis of preventive measures. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 275-89.
4. Tarlatzis BC, Fauser BC, Kolibianakis EM, Diedrich K, Rombauts L, Devroey P. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 333-40.
5. Nargund G, Fauser BC, Macklon NS, Ombelet W, Nygren K, Frydman R. The ISMAAR proposal on terminology for ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod* 2007; 23: 2801-4.
6. Pelinck MJ, Hoek A, Simons AMH, Heineman MJ. Efficacy of natural cycle IVF: a review of the literature. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 129-39.
7. Nargund G, Waterstone J, Bland J, Parson J, Campbell S. Cumulative conception and live birth rates in natural (unstimulated) IVF cycles. *Hum Reprod* 2001; 16: 259-62.
8. Feldman B, Seidman DS, Levron J, Bider D, Shulman A, Shine S, et al. In vitro fertilization following natural cycles in poor responders. *Gynecol Endocrinol* 2001; 15: 328-34.
9. Elizur SE, Aslan D, Shulman A, Wisc B, Bider D, Dor J. Modified natural cycle using GnRH antagonist can be an optimal treatment in poor responders undergoing IVF. *J Assisted Reprod Genet* 2005; 22: 75-9.
10. Papaleo E, De Santis L, Fusi F, Doldi N, Brigante C, Marelli G, et al. Natural cycle as first approach in aged patients with elevated follicle-stimulating hormone undergoing intracytoplasmic sperm injection: A pilot study. *Gyn Endocrinol* 2006; 22: 351-4.
11. Rongieres-Bertrand C, Olivennes F, Righini C, Fanchin R, Taieb J, Hamamah S, 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.
12. Tomažević T, Geršak K, Meden Vrtovec H. Clinical parameters to predict the success of in vitro fertilization-embryo transfer in the natural cycle. *Assist Reprod* 1999; 9: 149-56.
13. Tomazevic T, Korosec S, Virant Klun I, Drobnic S, Verdenik I. Age, oestradiol and blastocysts can predict success in natural cycle IVF-embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 2007; 15: 220-6.
14. Vlaisavljević V, Kovačić B, Reljić M, Gavrić Lovrec V. Three protocols for monitoring follicle development in 587 unstimulated cycles of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *J Reprod Med* 2001; 892-8.
15. Jancar N, Kopitar AN, Ihan A, Virant Klun I, Bokal EV. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *J Assist Reprod Genet*. 2007; 24: 91-7.
16. Jancar N, Virant-Klun I, Osredkar J, Vrtacnik Bokal E. Apoptosis, reactive oxygen species and follicular anti-Müllerian hormone in natural versus stimulated cycles. *Reprod Biomed Online*. 2008; 16: 640-8.

17. Vrtačnik Bokal E, Jančar N, Virant Klun I. Follicular and serum anti-mullerian hormone in natural and stimulated cycles. *Hum Reprod* 2008; 23: i27-i28.
18. Heijnen E, Marinus JC, De Klerk C, Polinder S, Beckers NGM, Klinkert ER, et al. A mild treatment strategy for in-vitro fertilisation: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* 2007; 369: 743-9.
19. Pache TD, Wladimiroff JW, de Jong FH, Hop WC, Fauser BC. Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 1990; 54: 638-42.
20. Schipper I, Hop WC, Fauser BC. The follicle-stimulating hormone (FSH) threshold/window concept examined by different interventions with exogenous FSH during the follicular phase of the normal menstrual cycle: duration, rather than magnitude, of FSH increase affects follicle development. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1292-8.
21. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21: 200-14.
22. Fauser BC, Donderwinkel P, Schoot DC. The step-down principle in gonadotrophin treatment and the role of GnRH analogues. *Bailliers Clin Obstet Gynaecol* 1993; 7: 309-30.
23. Oehninger S, Hodgen GD. Induction of ovulation for assisted reproduction programmes. *Bailliers Clin Obstet Gynaecol* 1990; 4: 541-73.
24. Zeleznik AJ, Hutchison JS, Schuler HM. Interference with the gonadotropin-suppressing actions of estradiol in macaques overrides the selection of a single preovulatory follicle. *Endocrinology* 1985; 117: 991-9.
25. Hohmann FP, Laven JS, de Jong FH, Eijkemans MJ, Fauser BC. Low-dose exogenous FSH initiated during the early, mid or late follicular phase can induce multiple dominant follicle development. *Hum Reprod* 2001; 16: 846-54.
26. Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Van Opstal D, Beckers NG, Verhoeff A, et al. Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2007; 22: 980-88.
27. Spremembe in dopolnitve pravil obveznega zdravstvenega zavarovanja. Ur l RS 33/08.
28. Silberstein T, Timarchi JR, Gonzales L et al. Pregnancy outcome in in vitro fertilization decreases to plateau with repeated cycles. *Fertil Steril* 2005; 84: 1043-5.
29. Wang JG, Douglas NC, Dicken E, Nakhuda GS, Guarnaccia MM, Sauer MV. Cryopreservation of supernumerary high quality embryos predicts favorable outcomes for patients undergoing repeated embryos predicts favorable outcomes for patients undergoing repeated cycles of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008; 89: 368-74.
30. Bangsbo S, Pinborg A, Yding Andersen C, Nyboe Andersen A. Patients' attitudes towards donation of surplus cryopreserved embryos for treatment or research. *Hum Reprod* 2004; 19: 2415-9.
31. Zakon o zdravljenju neplodnosti in postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo (ZZNPOB). Ur l RS 70/00.
32. Jones HW, Cohen J, Cooke I, Kempers R. IFFS Surveillance 07. *Fertil Steril* 2007; 87 Suppl 1: S1-S61.

Prispelo 2009-09-03, sprejeto 2009-10-01