

## ÚLOHA LUTEINIZAČNÉHO HORMÓNU V PROTOKOLOCH STIMULÁCIE OVULÁCIE V IVF CYKLOCH

Peter Harbulák, Zuzana Behúňová, Iveta Stenová, Gabriela Il'ková,  
Marek Drábek, Iveta Konýčková

V štúdií sme sa zamerali na porovnanie úspešnosti gonadotropínových preparátov s obsahom luteinizačného hormónu v stimulačných protokoloch v cykloch IVF. V retrospektívnej analýze sme súbor 390 normorespondentných pacientok rozdelili do 4 podskupín v závislosti od použitých gonadotropínových preparátov s obsahom luteinizačnej aktivity (HMG, uFSH, rFSH + HMG, rFSH + rLH). Sledované parametre boli hodnotené u pacientok s vekom do 35 rokov a nad 35 rokov. Protokoly s obsahom luteinizačného hormónu majú vyššiu úspešnosť v porovnaní s protokolmi, v ktorých boli aplikované gonadotropíny so samotným rFSH. U pacientok do 35 rokov stimulovaných gonadotropínovými preparátmi s obsahom luteinizačného hormónu sme v sledovaných ukazovateľoch nezistili významné rozdiely. V skupine nad 35 rokov bol zistený nižší počet tehotností, v ostatných parametroch nebol zistený významný rozdiel.

**Kľúčové slová:** gonadotropíny, luteinizačný hormón, stimulácia ovulácie

### THE ROLE OF LUTEINIZING HORMONE (LH) IN OVARIAN STIMULATION PROTOCOLS IN IVF CYCLES

In this study we focused on comparison of successfulness of gonadotropin preparates with the content of luteinizing hormone in stimulation protocols in IVF cycles. In the retrospective analysis we divided the set of 390 normoresponding patients to 4 groups in dependence on used gonadotropin preparates with the content of luteinizing activity (HMG, uFSH, rFSH+HMG, rFSH+rLH). Monitored parameters were evaluated in patients at the age up to 35 years and over 35 years. The protocols with the content of luteinizing hormone have higher successfulness in comparison with protocols in which gonadotropins with rFSH itself were applied. In patients over 35 years stimulated by gonadotropin preparates with the content of luteinizing hormone we did not find any significant differences in monitored indicators. In the group over 35 years there was spotted a lower number of pregnancies, in the other parameters there was not any significant difference.

**Key words:** gonadotropins, luteinizing hormone, ovulation stimulation

Gynekol. prax 2011; 9 (4): 222-226

### Úvod

Stepheno a Edward, pionieri „in vitro fertilizácie“ (IVF), dosiahli po 10 rokoch pokusov prvú úspešnú tehotnosť po odbere oocyty v spontánnom cykle a prenose embrya do dutiny maternice po mimotelovom oplodnení, ktorá bola ukončená pôrodom Louise Brownovej v roku 1978. Po krátkom období vznikol názor, že pri vyššom počte získaných oocytov a transferovaných embryí sa zvyšuje šanca na otehotnenie. Nasledovali prvé stimulácie ovárií klomifencitrátom, ktorý bol neskôr nahradený gonadotropínovými preparátmi vyrábanými z moču menopauzálnych žien<sup>(1,2)</sup>.

Hormónu stimulujúcemu folikuly (FSH) sa pripisovala hlavná a nezastupiteľná úloha pri folikulárnom raste<sup>(3,4,5)</sup>, pri luteinizačnom hormóne (LH) sa opisovali obavy z jeho možného nepriaznivého vplyvu na vývoj oocyty a prípadnú včasnú tehotnosť<sup>(6,7,8)</sup>. To viedlo k snahám eliminovať LH z liekových preparátov používaných v stimulačných protokoloch.

Zdokonalenie technologických postupov vo výrobe gonadotropínov umožnilo produkciu chemicky čistejších (purifikovaných) preparátov s obsahom LH aktivity pod 1 %<sup>(9,10)</sup>.

Isoláciou ľudského genetického kódu možno najnovšie vyrábať gonadotropínové preparáty rekombinant-

nou technológiou z ovariálnych buniek čínskeho škrečka. Tieto preparáty obsahujú len samotný FSH.

Po zavedení gonadotropínov typu r-FSH do stimulácie sa rozvinula rozsiahla diskusia o výhodách<sup>(11,12,13)</sup> a nevýhodách<sup>(14,15)</sup> exogénneho LH v stimulácii. Pribúdajú názory, že aplikácia exogénneho LH je v niektorých skupinách pacientok potrebná na dosiahnutie dobrej stimulačnej odpovede<sup>(16,17,18,19,20,21,22)</sup>. V súčasnosti je dostupných viac druhov komerčných gonadotropínových preparátov s rozdielnym zložením a rozdielnou farmakodynamikou. Výber stimulačného protokolu, liekového preparátu a jeho dávkovanie sa musí individuálne prispôbiť každej pacientke.

### Súbor, metodika:

V rokoch 2005-2007 sme sledovali súbor 1015 normorespondentných pacientok rozdelených do 4 podskupín podľa aplikácie gonadotropínových preparátov a ich kombinácií v dlhých agonistových stimulačných protokoloch:

- 151 cyklov s gonadotropínmi typu r-FSH
- 361 cyklov s gonadotropínmi typu HMG
- 79 cyklov s gonadotropínmi typu r-FSH + r-LH
- 424 cyklov s gonadotropínmi typu r-FSH + HMG

Porovnaním výsledkov sme v sledovanom súbore potvrdili benefit LH v gonadotropínových preparátoch, ktoré

sme použili na stimuláciu v IVF cykloch. Vzhľadom na tieto klinické skúsenosti sme sa v rokoch 2008-2009 zamerali na porovnanie úspešnosti gonadotropínových preparátov s obsahom LH v stimulačných cykloch IVF. U všetkých pacientok bol aplikovaný IVF dlhý agonistový protokol s dennou aplikáciou analógu (triptorelin 0,1 mg). Súbor 390 pacientok sme rozdelili do štyroch podskupín podľa druhu FSH a LH aktivity:

- 91 cyklov s gonadotropínmi typu u-FSH
- 27 cyklov s gonadotropínmi typu HMG
- 125 cyklov s gonadotropínmi typu r-FSH + r-LH
- 147 cyklov s gonadotropínmi typu r-FSH + HMG

Pacientky boli hodnotené vo dvoch vekových skupinách ( $\leq 35$  a  $> 35$  rokov). V jednotlivých podskupinách sme porovnávali rozdielne formy LH aktivity, ich optimálnu dávku a deň začiatku suplementácie v stimulácii.

Kritériá zaradenia do súboru boli vek do 40 rokov, normorespondentné pacientky, hladina bazálneho FSH  $< 10$  IU/L na 3. deň MC (menštruačného cyklu), 1. až 3. IVF cyklus. Kritériá vyradenia zo súboru boli vek nad 40 rokov (vrátane), hladina bazálneho FSH  $\geq 10$  IU/L na 3. deň MC, získaných menej ako 5 oocytov v IVF cykle, hladina estradiolu menej ako 1000 pg/ml v deň aplikácie HCG, pacientky s PCOS (syndrómom polycystických ovárií) podľa Rotterdamských kritérií.

Hodnotenú parametre: výťažnosť oocytov a embryí v skupinách pacientov, počet gravidít na embryotransfer - pregnancy rate (PR), počet klinických gravidít na embryotransfer - clinical pregnancy rate (CPR), počet vitálnych gravidít na embryotransfer - ongoing pregnancy rate (OPR), spotreba gonadotropínov, výška endometria, počet dní aplikácie LH, hodnoty E2, LH, P v deň aplikácie HCG.

Na štatistické vyhodnotenie získaných výsledkov boli použité:

- ANOVA test - analýza rozptylu hodnôt dvoch alebo viacerých vzoriek.
- Dvojvýberový t-test s nerovnosťou odchýlok testuje rovnosť stredných hodnôt základných súborov jednotlivých vzoriek.
- Chi-square test (chi-kvadrátový test) je štatistický test spočívajúci v porovnávaní testovaných údajov s chi-kvadrátovým rozdelením početnosti.

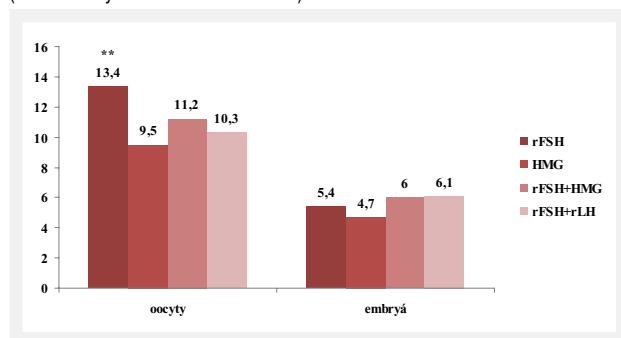
Pri  $P > 0,05$  sme hodnotili parameter ako bezvýznamný (NS),  $P < 0,01-0,05$  ako významný (+),  $P < 0,01$  ako vysoko významný (++) a  $P < 0,001$  ako veľmi významný (+++).

### Výsledky

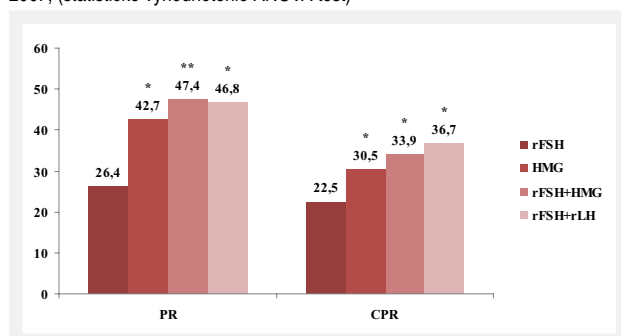
V podskupine s r-FSH bol signifikantne vyšší počet odobratých oocytov v porovnaní s tromi podskupinami, u ktorých boli v stimulácii ovulácie podávané gonadotropíny s LH aktivitou. Vo všetkých štyroch podskupinách bol porovnateľný počet embryí, ale boli signifikantne vyššie hodnoty PR a CPR v troch podskupinách s LH aktivitou. Medzi podskupinami, ktorým boli aplikované gonadotropíny s LH aktivitou, boli v sledovaných parametroch porovnateľné výsledky (graf 1, 2).

Vzhľadom na tieto klinické skúsenosti sme sa v rokoch 2008-2009 zamerali na porovnanie úspešnosti pri gonadotropínových preparátoch s obsahom LH v stimulačných cykloch IVF. V jednotlivých podskupinách sme sa snažili porovnať rozdielne formy LH aktivity, ich optimálnu dávku a čas začatia suplementácie.

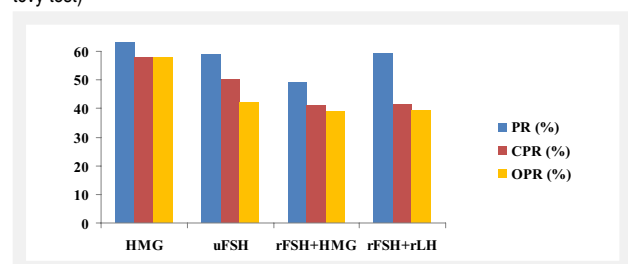
**Graf 1.** Priemerná výťažnosť oocytov a embryí na cyklus v rokoch 2005-2007, (štatistické vyhodnotenie ANOVA test)



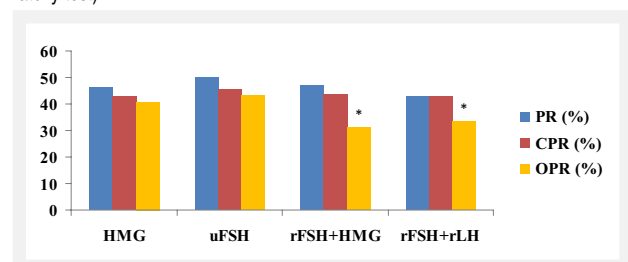
**Graf 2.** Pregnancy rate a clinical pregnancy rate (%) na cyklus v rokoch 2005-2007, (štatistické vyhodnotenie ANOVA test)



**Graf 3.** PR, CPR a OPR do 35 rokov (%), (štatistické vyhodnotenie Chi-kvadrátový test)



**Graf 4.** PR, CPR a OPR nad 35 rokov (%), (štatistické vyhodnotenie Chi-kvadrátový test)



Vo vekovej skupine pacientok do 35 rokov boli výsledky z hľadiska dosiahnutých tehotností na embryotransfer porovnateľné (graf 3). Zo sledovaných údajov spotreby gonadotropínov vyplýva, že pridaním LH do stimulácie dochádza k zníženiu spotreby r-FSH (graf 5). Najvyššia spotreba gonadotropínov a najnižšia výťažnosť oocytov bola v podskupine samotného HMG-HP. Z toho vyplýva, že z pohľa-

du efektívnosti aplikovanej liečby sa javí pomer FSH/LH 1 : 1 u normoresponderov v tejto vekovej skupine príliš vysoký, aj keď výsledky dosiahnutého PR sú porovnateľné. Najvyššia efektívnosť bola v podskupine r-FSH/r-LH v dávke 75 IU od 6. do 7. DS (dňa stimulácie) (graf 3, tabuľka 1).

Vo vekovej skupine pacientok nad 35 rokov môže byť prínosom skoršia suplementácia LH (od 3. do 4. DS) v dáv-

Tabuľka 1. Hodnotené parametre v sledovanej skupine pacientok do 35 rokov, (štatistické vyhodnotenie ANOVA test)

	Do 35 rokov				Hladina významnosti
	HMG	uFSH	rFSH+HMG	rFSH+rLH	
Celkový počet pacientok	20	80	113	109	
Priemerný vek pacientok	30,80±2,77	30,84±2,85	31,55±2,72	30,7115±23,03	NS
Priemerné hodnoty bazálneho FSH	6,63±1,59	6,84±1,53	6,89±1,83	7,02±1,83	NS
Priemerné hodnoty LH na 6. deň stimulácie	2,66±2,63	1,84±1,09	1,79±1,05	2,5432±1,646	NS
Priemerné hodnoty posledne nameraného LH	3,25±2,70	2,10±1,06	2,10±1,11	3,211±1,618	NS
Priemerné hodnoty posledne nameraného estradiolu	1838,7±773,1	2069,2±922,4	2305,6±1026,7	2525,1±972,7	NS
Priemerné hodnoty posledne nameraného progesterónu	0,72±0,25	0,74±0,28	0,79±0,34	0,8426±0,31	NS
Priemerné hodnoty posledne nameranej výšky endometria	10,58±2,21	11,00±1,83	11,22±2,24	10,7692±5,13	NS
Priemerný počet dní stimulácie	12,10±2,12	11,13±2,13	10,223±1,56	10,8558±1,882	NS
Priemerný počet dní stimulácie s LH	12,06±1,78	11,06±2,20	7,89±2,13	5,125±2,089	***
Priemerný počet odoberatých oocytov	10,00±6,34	14,35±7,07	13,12±6,28	13,3077±6,472	*
Priemerný počet získaných embryí	7,6	8,3	8,2	7,7451±4,715	NS
Pregnancy rate (%)	63,16	58,97	49,11	59,41	NS
Clinical pregnancy rate (%)	57,89	50,00	41,07	41,58	NS
Ongoing pregnancy rate (%)	57,89	42,31	39	39,6	NS

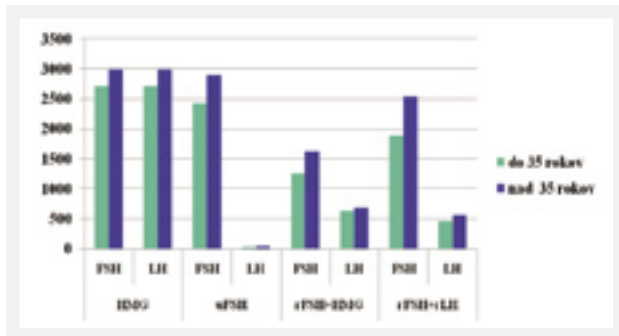
Tabuľka 2. Hodnotené parametre v sledovanej skupine pacientok nad 35 rokov, (štatistické vyhodnotenie ANOVA test).

	Nad 35 rokov				Hladina významnosti
	HMG	uFSH	rFSH+HMG	rFSH+rLH	
Celkový počet pacientok	7	11	34	16	
Priemerný vek pacientok	36,71±0,70	37,27±0,75	37,12±1,43	36,8667±0,915	NS
Priemerné hodnoty bazálneho FSH	6,32±1,44	6,55±1,21	7,19±1,90	6,50±1,44	NS
Priemerné hodnoty LH na 6. deň stimulácie	1,79±0,54	1,63±0,73	2,08±1,13	2,2747±1,0824	NS
Priemerné hodnoty posledne nameraného LH	2,65±1,12	1,78±0,70	2,40±1,53	2,7733±0,9788	NS
Priemerné hodnoty posledne nameraného estradiolu	1948,7±503,7	1901,6±730,1	2587,5±868,1	2159,933±783,44	NS
Priemerné hodnoty posledne nameraného progesterónu	0,78±0,29	0,91±0,28	0,75±0,29	0,6453±0,2643	NS
Priemerné hodnoty posledne nameranej výšky endometria	10,79±1,31	10,86±1,91	11,54±1,90	11,4667±2,1503	NS
Priemerný počet dní stimulácie	10,57±1,92	12,00±2,30	10,21±1,35	11,4±2,0976	NS
Priemerný počet dní stimulácie s LH	9,80±0,75	12,00±2,30	8,50±1,93	6,5333±2,2949	***
Priemerný počet odoberatých oocytov	9,6±4,17	12,55±4,29	12,15±5,92	10,333±3,9036	*
Priemerný počet získaných embryí	5,6	7,8	8,1	6,8±2,4553	NS
Pregnancy rate (%)	46,1	50,0	46,9	42,86	NS
Clinical pregnancy rate (%)	42,9	45,45	43,8	42,86	NS
Ongoing pregnancy rate (%)	41,0	43,5	31,3	33,4	*

Tabuľka 3. Hodnotené parametre v sledovanej skupine pacientok ≤ 35 a 35 > rokov, (štatistické vyhodnotenie ANOVA test)

	Spolu	Do 35 rokov	Nad 35 rokov	Hladiny významnosti
	hodnota	hodnota	hodnota	
Priemerné hodnoty posledne nameraného LH	2,51±1,45	2,53±1,49	2,33±0,92	NS
Priemerné hodnoty posledne nameraného progesterónu	0,782±0,31	0,787±0,32	0,75±0,30	NS

**Graf 5.** Priemerná spotreba gonádotropínov v skupine pacientok do a nad 35 rokov, (štatistické vyhodnotenie Dvojvýberový t-test s nerovnosťou odchýlok)



ke LH 75-150IU. Dosiahli sme porovnateľné výsledky vo všetkých sledovaných parametroch až na nižšiu klinickú úspešnosť (OPR), ktorá sa môže vysvetliť vyšším výskytom aneuploidii u embryí v tejto vekovej skupine (graf. 4, tabuľka 2).

Hodnoty LH a progesterónu v deň aplikácie HCG pri spustení ovulácie sú porovnateľné vo všetkých podskupinách (tabuľka 3). To potvrdzuje, že aplikované gonadotropíny s LH aktivitou nespôsobujú predčasnú luteinizáciu.

### Diskusia

Do určitej miery možno súhlasiť s autormi, ktorí poukazujú na fakt, že v skupine normoresponderov nie je nevyhnutná suplementácia LH v neskornej folikulárnej fáze a k adekvátnej odpovedi na stimuláciu dochádza aj po stimulácii samotným r-FSH, pretože hladina endogénneho LH je v skupine pacientok do 35 rokov dostatočná a len 1 % obsadených LH receptorov je dostatočné na dosiahnutie adekvátnej odpovede pri stimulácii<sup>(24)</sup>. Aj v tejto skupine pacientok však možno pozorovať, že prídanie 75IU r-LH denne v neskornej folikulárnej fáze vedie k zlepšeniu odpovede na stimuláciu, čo má priaznivý vplyv na rast folikulu, maturáciu oocyty a má za následok zníženie nevyhnutnej dávky r-FSH pri stimulácii.

U pacientok po predchádzajúcich opakovaných operáciách na ováriách, najčastejšie pri endometrióze, slabšej odpovedi na stimuláciu v predchádzajúcom cykle IVF, laboratórnych a UZV parametroch blížiacich sa k skupine „low“ responders, t. j. nižšom počte folikulov pri AFC (antral follicle count), vyššej hladine FSH 3. DC, zníženej ovariálnej rezerve verifikovanej hodnotami AMH (antimüllerian hormon), sa najvhodnejšou ukazuje aplikácia LH aktivity

v dávke 150IU od začiatku stimulácie. V tejto skupine pacientok môžu byť prínosom purifikované urinárne gonadotropíny, pri ktorých je HCG súčasťou LH aktivity, vzhľadom na dlhší biologický polčas v porovnaní s r-LH.

V skupine hyperresponderov a PCOS sa benefit podania LH počas neskornej folikulárnej fázy prejaví v podpore dozrievania najväčších folikulov, kým pri menších folikuloch dochádza k apoptóze, čím sa výrazne znižuje riziko hyperstimulačného syndrómu<sup>(24)</sup>. V skupine normoresponderov, hyperresponderov a PCOS sa ako metóda voľby odporúča využitie r-LH v dávke 75IU, aplikovanej v druhej polovici folikulárnej fázy pre kratší biologický rozpad a presnejšie dávkovanie v porovnaní s HMG-HP. Polčas rozpadu HCG je viac ako trojnásobne dlhší v porovnaní s r-LH a má vyššiu väzobnú afinitu na LH receptor, čo môže predlžovať jeho účinok a viesť k akumulácii LH aktivity, ktorá sa môže dostať nad úroveň stropovej hladiny a môže mať škodlivý vplyv na oocyt. Naproti tomu aplikácia r-LH umožňuje pridávať množstvo LH presne podľa individuálnej potreby pacientky.

### Záver

Podľa súčasných záverov viacerých štúdií aj záverov nášho výskumu sa u väčšiny pacientok potvrdil význam LH v stimulovaných IVF cykloch. Substitúcia LH by mala byť súčasťou rutínnej klinickej praxe. Dosiahnutie porovnateľných výsledkov vo všetkých skupinách je možné len pri prísnej individualizácii prístupu u každej pacientky.

### Adresa pre korešpondenciu:

MUDr. Peter Harbulák, PhD.  
GYN-FIV, a. s., centrum pre gynekológiu, urológiu a asistovanú reprodukciu, Bratislava  
Záhradnícka 42, 821 08 Bratislava  
e-mail: harbulak@gyn-fiv.sk

MUDr. Zuzana Behúňová, PhD., MUDr. Iveta Stenová, PhD.,  
MUDr. Gabriela Ilkovičová, PhD., MUDr. Marek Drábek, PhD.,  
Ing. Iveta Konyčková  
GYN-FIV, a. s., centrum pre gynekológiu, urológiu a asistovanú reprodukciu Bratislava

### literatúra

- Lunenfeld B, Sulimovici S, Rabau E, et al. La induction de la ovulation dans les amenorrhées hypophysaires par un traitement combiné de gonadotrophins urinaires menopausiques et de gonadotrophins chorioniques. C R Soc Franc Gynecol 1962; 3: 346.
- Donini P, Puzzuoli D, Montezemolo R.: Purification of gonadotropin from human menopausal urine. Acta Endocrinol 1964; 45: 329.
- Barnes RB, Namnoum AB, Rosenfield RL. Et al. The role of LH and FSH in ovarian androgen secretion and ovarian follicular development: clinical studies in a patient with isolated FSH deficiency and multicystic ovaries. Hum Reprod 2002; 1: 88-91.
- Hillier SG.: Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. Hum Reprod 1994; 9: 188-191.
- Couzinet B, Lestrat N, Brailly S. et al. Stimulation of ovarian follicular maturation with pure follicle-stimulating hormone in women with gonadotropin deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1988; 66: 552-556.

- Regan L, Owen EJ, Jacobs HS. Hypersecretion of luteinizing hormone, infertility, and miscarriage. Lancet 1990; 336: 1141-1144.
- Watson H, Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, et al. Hypersecretion of luteinizing hormone and ovarian steroids in women with recurrent early miscarriage. Hum Reprod 1993; 8: 829-833.
- Howles CM. Role of LH and FSH in ovarian function. Mol Cell Endocrinol 2000; 161: 25-30.
- Le Cotonneq JY, Porchet HC, Beltrami V, et al. Comparative pharmacokinetics of two urinary human follicle stimulating hormone preparations in healthy female and male volunteers. Hum Reprod 1993; 8: 1604-1611.
- Howles CM, Loumaye E, Giroud D, et al. Multiple follicular development and ovarian steroidogenesis following subcutaneous administration of a highly purified urinary FSH preparation (Metrodin High Purity) in pituitary desensitized women undergoing IVF-ET: a multicentre European phase III. Hum Reprod 1994; 9: 424-430.

11. Selman HA, DeSanto M, Sterzik K, et al. Effect of highly purified urinary follicle-stimulating hormone on oocyte and embryo quality. *Fertil Steril* 2002; 78: N 5.
12. Platteau P, Smitz J, Albano C, et al. Exogenous luteinizing hormone activity may influence the treatment outcome in in vitro fertilization but not in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004; 81: 1401-1404.
13. Andersen AN, Devroey P, Arce JC. Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor - blind controlled trial. *Hum Reprod* 2006; 21: 3217-3225.
14. Daya S, Gunby J. Recombinant versus urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction cycles. In: *The Cochrane Library, Issue 3. Oxford: Update Software* 2002.
15. Ludwig M, Rabe T, Bühler K, et al. Wirksamkeit von rekombinatem humanem FSH im Vergleich zu urinärem hMG nach Downregulation im langen Protokoll - Eine Analyse von 24.764 ART-Zyklen in Deutschland. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2004; 1: 284-288.
16. Loumaye E, Engrand P, Howles CM, et al. Assessment of the role of serum luteinizing hormone and estradiol response to follicle-stimulating hormone on in vitro fertilization treatment outcome. *Fertil Steril* 1997; 67: 889-899.
17. Fleming R, Lloyd F, Herbert M, et al. Effects of profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation on follicular activity, oocyte and embryo function in cycles stimulated with purified follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1998; 13: 1788-1792.
18. Westergaard LG, Laursen SB, Andersen CY. Increased risk of early pregnancy loss by profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation in normogonadotrophic women undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod* 2000; 15: 1003-1008.
19. Balasch J, Creus M, Fabregues F, et al. The effect of exogenous luteinizing hormone (LH) on oocyte viability: evidence from a comparative study using recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH) alone or in combination with recombinant LH for ovarian stimulation in pituitary-suppressed women undergoing assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 250-256.
20. Fanchin R, Schönauer L, Righini C, et al. Beneficial effects of residual LH levels after GnRH agonist on ovarian response to r-FSH, embryo quality, and IVF-ET outcome. *Fertil Steril* 2001; 76, Suppl 1: 91.
21. Humaidan P, Bungum L, Bungum M, et al. Ovarian response and pregnancy outcome related to mid-follicular LH levels in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and recombinant FSH stimulation. *Hum Reprod* 2002; 17: 2016-2021.
22. DePlacido G, Alviggi, C, Mollo A, et al. Effects of recombinant LH (rLH) supplementation during controlled ovarian hyperstimulation (COH) in normogonadotrophic women with an initial inadequate response to recombinant FSH (rFSH) after pituitary downregulation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60: 637-643.
23. Alviggi C, Clarizia R, Mollo A, et al. Who needs LH in ovarian stimulation? *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 35-44.
24. Howles CM, Macnamee MC. The endocrinology of stimulated cycles and influence on outcome. In Mashiach, S. a spol. (eds), *Advances in assisted Reproductive Technologies*. Plenum Press, New York, 1990, s. 311-325.