

Strokovni prispevek/Professional article

# MNOGOPLODNE NOSEČNOSTI PO POSTOPKIH NEPOSREDNEGA VNOSA SEMENČICE V CITOPLAZMO JAJČNE CELICE (ICSI)

MULTIPLE PREGNANCIES AFTER INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI)

*Branko Zorn, Irma Virant-Klun, Sašo Drobnič, Tomaž Tomaževič, Helena Meden-Vrtovec*

Klinični oddelek za reprodukcijo, Ginekološka klinika, Klinični center, Šlajmerjeva 3, 1525 Ljubljana

Prispelo 2003-05-14, sprejeto 2003-06-19; ZDRAV VESTN 2003; 72: Supl. II: 125-7

**Ključne besede:** neposredni vnos semenčice v citoplazmo jajčne celice; mnogoplodna nosečnost; monozigotni dvojčki; blastocista; zamrzovanje in odmrzovanje blastocist

**Izvleček** – Izhodišča. Zaradi zapletov, ki jih spremljajo, predstavljajo mnogoplodne nosečnosti v postopkih zunajtelesne oploditve velik problem. Metoda neposrednega vnosa semenčice v citoplazmo jajčne celice (ICSI) lahko poveča tveganje za razvoj monozigotne nosečnosti. Želeli smo ugotoviti, ali se mnogoplodne nosečnosti v postopkih ICSI razlikujejo od tistih v postopkih klasične zunajtelesne oploditve (IVF) in, ali je prenos enega zarodka ali največ dveh zarodkov učinkovit pri preprečevanju mnogoplodne nosečnosti.

**Metode.** Retrospektivno smo analizirali podatke o incidenci mnogoplovnih nosečnosti pred in po uvedbi prenosa omejenega števila zarodkov.

**Rezultati.** Ob prenosu dveh manjceličnikov (drugi dan) ali blastocist (peti dan) in dobri stopnji zanositve je incidenca mnogoplovnih nosečnosti 25% oziroma 17%. Po prenosu ene blastociste je stopnja zanositve najvišja (32,5%) in incidenca mnogoplovnih nosečnosti najnižja (0%).

**Zaključki.** Najboljši način, da se izognemo mnogoplovnim nosečnostim, je prenos enega zarodka ali največ dveh zarodkov. Ena sama monozigotna dvoplodna nosečnost, ki smo jo ugotovili, je nastala po prenosu odmrznjene blastociste.

## Uvod

Neposredni vnos semenčice v citoplazmo jajčne celice (ICSI) z uporabo semenčic iz ejakulata, nadmodka in moda je prvič uspel l. 1992; od takrat je to zdravljenje priznано za pare, prizadete z moško neplodnostjo. Tako ICSI kakor klasična zunajtelesna oploditev (IVF) večata možnost mnogoplovnih nosečnosti z vsestranskimi posledicami. Priporočljiva sta preprečenje hiperstimulacije in prenos (ET) enega zarodka oz. največ dveh zarodkov. Glede na literaturo obstaja še možnost monozigotnih dvojčkov (MZD). To je patologija, ki jo danes pogosteje srečamo po ICSI, zlasti po prenosu blastocist.

**Key words:** intracytoplasmic sperm injection; twinning pregnancy; monozygotic twinning; blastocyst; blastocyst freezing-thawing

**Abstract** – Background. Because of complications related to multiple pregnancies after in vitro fertilization this pathology represent a real problem. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) may lead to higher risk in developing monozygotic pregnancies. We sought to investigate whether the multiple pregnancies after ICSI differ of those consecutive to classical in vitro fertilization (IVF) and if counseling for transferring one or at most two embryos is efficient in preventing multiple pregnancies.

**Methods.** We analyzed retrospectively data concerning the incidence of multiple pregnancies before and after the transfer of limited number of embryos.

**Results.** In transferring two cleaving-stage embryos (day 2) or blastocysts (day 5), when pregnancy rate is high, the incidence of multiple pregnancies is 25 and 17%. After transfer of one blastocyst the highest the pregnancy rate and the lowest the incidence of multiple pregnancies.

**Conclusions.** The best way to avoid multiple pregnancies consist in transferring one or at most two embryos. The monozygotic twin pregnancy we observed was consecutive to the transfer of frozen-thawed blastocyst.

## Material in metode

Retrospektivno smo analizirali incidenco mnogoplovnih nosečnosti pri parih, vključenih v postopke IVF in ICSI. Pare smo razdelili glede na obdobja. Med l. 1996 in l. 1998 smo zarodke gojili 2 dni do manjceličnikov z dvema celicama do šestimi celicami. V letu 2000 smo pri nekaterih naključno izbranih parih zarodke gojili 2 dni, pri drugih pa 5 dni do razvojne stopnje blastociste. V letu 2001 in dalje smo pri vseh parih gojili zarodke do razvojne stopnje blastociste v zaporednih gojiščih – BlastAssistSystem (Medi-Cult, Jyllinge, Denmark). Ugotavljali smo statistično razliko v incidenci večplodnih nosečnosti med skupinami ICSI, IVF in splošne populacije, v skupinah s prenosom manjceličnih zarodkov in blastocist s po-

močjo testa  $\chi^2$ . Vzorci so se med seboj značilno razlikovali pri  $p < 0,05$ .

## Rezultati

V obdobju 1996–2002 je ICSI je predstavljal 35% vseh postopkov zunajtelesne oploditve.

Naši podatki kažejo, da je bila incidenca mnogoplovnih nosečnosti v postopkih ICSI in IVF med l. 1996 in l. 1998 bistveno večja, kot je incidenca v splošni populaciji: 20% oziroma 26% proti 1,3%. Z mnogoplovnimi nosečnostmi je povezanih več prezgodnjih porodov in prirojenih napak kot v splošni populaciji (razpr. 1). Razlike v stopnjah prirojenih napak, prezgodnjih porodov in mnogoplovnih nosečnosti med populacijami zunajtelesne oploditve in splošno populacijo so statistično pomembne.

Razpr. 1. *Delež prirojenih napak, prezgodnjih porodov in večplodnih nosečnosti pri otrocih po ICSI in klasičnem IVF glede na starost matere in število prenešenih zarodkov. Primerjava s podatki splošne populacije Slovenije.*

Table 1. *Incidence of congenital malformations, preterm deliveries and multiple pregnancies in newborns after ICSI and classical IVF, according to mother age and number of embryos transferred. Comparison with data from general Slovene population.*

Klinični podatki Clinical data	ICSI	IVF	Splošna populacija General population
Obdobje rojstev otrok Period	April 1996–marec 1998 April, 1996–March, 1998		
Število rojenih otrok Number of newborns	101	304	37050
Starost mater (leta) Maternal age (years)	32 ± 4	34 ± 6	28 ± 6
Število prenešenih zarodkov Number of embryo transferred	1,8	1,7	
Prirojene napake (št./%) Congenital malformations (No./%)	8 (7,9) <sup>sa</sup>	31 (10,2) <sup>sb</sup>	2172 (5,9) <sup>sc</sup>
Prezgodnji porodi (št./%) Preterm deliveries (No./%)	13 (13) <sup>sd</sup>	41 (13) <sup>se</sup>	2119 (5,7) <sup>sf</sup>
Večplodne nosečnosti (št./%) Multiple pregnancies (No./%)	16 (20) <sup>sg</sup>	60 (26) <sup>sh</sup>	493 (1,3) <sup>si</sup>

\* b, c / d, f / e, f / g, i / h, i – statistično pomembna razlika ( $p < 0,05$ ).  
– statistically significant difference ( $p < 0,05$ ).

Ko smo v letu 2000 prenesli zarodke manjceličnike, je bila stopnja zanositve po prenosu enega zarodka 6%, po prenosu dveh zarodkov pa 22%. Dvoplovnih nosečnosti ni bilo po prenosu enega zarodka, po prenosu dveh zarodkov pa jih je bilo 25% (razpr. 2). Statistično pomembnih razlik v stopnji zanositve in mnogoplovnih nosečnosti ni bilo.

V obdobju 2001–2002 je bila stopnja zanositve po prenosu enega zarodka 32,5%, po prenosu dveh zarodkov pa 43,5%. Po prenosu ene blastociste nismo opazili dvoplovnih nosečnosti. Po prenosu dveh blastocist pa je bila incidenca dvoplovnih nosečnosti 17% (razpr. 3). Stopnja zanositve se ne razlikuje med skupinama, stopnja dvoplovnih nosečnosti pa se. V obdobju 2000–2002 nismo opazili nobene tri- ali večplodne nosečnosti. Opazili smo eno monozigotno nosečnost z razvojem dvojčkov. Nastala je po prenosu odmrznjene blastociste.

## Razpravljanje in sklepi

Eden od največjih izzivov v asistiranu reprodukciji je izogniti se mnogoplovnim nosečnostim, ne da bi s tem znižali stopnjo

Razpr. 2. *Stopnja nosečnosti in incidenca dvoplovnih nosečnosti v postopkih ICSI s prenosom manjceličnih zarodkov.*

Table 2. *Pregnancy rate and incidence of twin pregnancies in ICSI after low-cell embryos transfer.*

Obdobje Period	ICSI Prenos manjceličnikov (drugi dan) ICSI Clearing-stop embryo transfer (day 2)	
	Leto 2000 Year 2000	
Preneseni zarodki Embryotransferred	1 zarodek 1 embryo	2 zarodka 2 embryos
Število prenosov zarodkov Number of embryo transfers	64	170
Stopnja zanositve/ET (%) Pregnancy rate/ET	6	22
Dvoplovdne nosečnosti (%) Twin pregnancies (%)	0	25

Razpr. 3. *Stopnja nosečnosti in incidenca dvoplovnih nosečnosti v postopkih ICSI po prenosu blastocist.*

Table 3. *Pregnancy rate and incidence of twin pregnancies in ICSI after blastocyst transfer.*

Obdobje Period	ICSI Prenos blastocist (peti dan) ICSI Transfer of blastocysts (day 5)	
	Leti 2001–2002 Period 2001–2002	
Prenešene blastociste Transfer of blastocysts	1 blastocista 1 blastocyst	2 blastocisti 2 blastocysts
Število prenosov zarodkov Number of embryo transfers	40	262
Stopnja nosečnosti/ET (%) Pregnancy rate/ET (%)	32,5	43,5
Dvoplovdne nosečnosti (%) Twin pregnancy	0 <sup>sa</sup>	44 (17) <sup>sb</sup>

\* a, b – statistično pomembna razlika ( $p < 0,05$ )  
– statistically significant difference ( $p < 0,05$ )

nosečnosti. Incidenca mnogoplovnih nosečnosti pri ženskah v postopku ICSI, vključenih v našo študijo, je podobna tisti pri navadnem IVF: v primerjavi z ameriškimi študijami, ki navajajo tudi do 50% mnogoplovnih nosečnosti (1), je nizka, vendar primerljiva z incidenco mnogoplovnih v novejših evropskih študijah (2). Naše rezultate si razložimo s pravilom, da prenašamo v maternico največ 3 zarodke (3). Manjši del mnogoplovnih nosečnosti je povezan z manjšim odstotkom carskih rezov in manjšim odstotkom nedonošenih otrok. Mnogoplovdne nosečnosti so lahko vzrok za zastoj rasti z večjo umrljivostjo in obolevnostjo in za kasnejšo nevrološko prizadetost pri preživelih (4).

Razvoj gre v smer prenosa enega (5) in to dobrega zarodka (6). Idealno bi bilo pridobiti zarodek dobre kakovosti po naravnem ciklu: zdravljenje z gonadotropini je namreč največji povzročitelj mnogoplovnih nosečnosti. Vendar glede na stopnjo zanositve naši rezultati po postopku ICSI niso dovolj dobri, da bi lahko naravni cikel sistematično priporočali za preventivo mnogoplovdne nosečnosti v postopku ICSI. Naši podatki niso primerljivi s tistimi iz skupine Martikainen (5), ki je dokazala, da je po prenosu enega zarodka dobre kakovosti na dan 2 možno izločiti tveganje za mnogoplovdno nosečnost in doseči dobro stopnjo nosečnosti. Ob prenosu enega manjceličnika se popolnoma izognemo mnogoplovnim nosečnostim, a je stopnja zanositev prenizka. V postopkih IVF in ICSI je razvoj zarodka do razvojne stopnje blastociste najboljši kazalec kakovosti zarodka (7). Ob prenosu ene blastociste dosežemo ob isti stopnji zanositve manj mnogoplovnih nosečnosti.

O povečani možnosti monozigotnih dvojčkov (MZD) po IVF je prvi poročal Yovich l. 1984 (8). Po postopkih IVF in ICSI je incidenca MZD 1,2 do 8,9%, medtem ko je naravna incidenca

0,4%. Tarlatzis je ugotovil večjo incidenco MZD po postopkih ICSI kot po IVF (5,9 proti 0%). Vsi MZD so bili monohoriati in biamniati (9). Oploditev ene same jajčne celice in nato delitev zigote privede do identičnih, monozigotnih dvojčkov. Čeprav ne poznamo popolnoma mehanizma nastajanja MZD, so raziskovalci mnenja, da do MZD pride zaradi delitve notranje celične mase v zgodnjem razvoju. Dejavniki, ki omogočajo tako delitev, so poškodbe zone pellucide, čas implantacije in tehnika asistirane oploditve. Vse metode mikromanipulacije zone pellucide (inseminacija pod zono pellucido in ICSI) lahko povzročajo MZD (10). Umetno odpiranje zone pellucide moti proces izluščenja med ugnjezditevijo. Delitev trofoblasta in notranje celične mase lahko nastane med izhodom blastociste skozi umetno luknjo v zoni pellucidi. V primeru ene same luknje blastocista v obliki številke osem privede do MZD, medtem ko se pri več luknjah (ki so posledica večkratne mikromanipulacije) proces herniacije pomnoži in lahko pripelje do monozigotnih trojčkov. Tudi z metodo mehanskega asistiranja hatchinga je več MZD.

Ugotovili smo eno MZD. Nastala je po prenosu odmrznjene blastociste. Bila je monohoriata biamniata. MZD pogosteje nastanejo po prenosu blastocist (11). Delitev zarodka lahko nastane 4 do 8 dni po oploditvi v času implantacije. Kasnejši prenos zarodka v obliki blastociste naj bi še povečal možnost poškodbe zaradi daljše izpostave in manipuliranja zone pellucide. Ta proces se še bolj izraža ob zamrzovanju blastociste. Velika incidenca večplodnih nosečnosti pri asistiranem reprodukciji, tako po IVF kot po ICSI, zahteva spremembe, to je prenos največ dveh zarodkov. Tak pristop je še posebej priporočljiv pri mladih ženskah (do 34 let), v prvem ali drugem postopku ICSI, ko je kakovost zarodka dobra: v teh primerih je namreč tveganost za mnogoplodno nosečnost največja (6). Prenos enega samega zarodka izvedemo po pisnem soglasju ženske oz. para. Rezultati kažejo, da je tak pristop varen, saj večplodnih nosečnosti skoraj ni več, in učinkovit, saj oploditev in zanositev nista spremenjeni v primerjavi s prenosom dveh zarodkov. Poleg tega je tudi program zamrzovanja zarodkov zelo uspešen in omogoča varno zamrzovanje nadštevlnih zarodkov. V nasprotju z manjceličniki je gojenje do bla-

stocist in njihovo hranjenje zahtevnejši postopek. Prihodnost nam bo tudi pokazala, ali sta ICSI in prenos blastociste res povzročitelja monozigotnih dvojčkov. To naj bi nas spodbujalo k večji pozornosti pri indikacijah za ICSI. Par mora biti dodatno informiran o možnosti te vrste nosečnosti in tveganjih pri tem (12).

## Literatura

1. Palermo GD, Colombero LT, Schattman GL, Dawis KO, Rosenwaks Z. Evolution of pregnancies and initial follow-up of newborns delivered after intracytoplasmic sperm injection. *JAMA* 1996; 346: 1893-7.
2. Wennerholm UB, Bergh C, Hamberger L, Westlander G, Wikland M, Wood M. Obstetric outcome of pregnancies following ICSI, classified according to sperm origin and quality. *Hum Reprod* 2000; 15: 1189-94.
3. Zorn B, Virant-Klun I, Drobnič S et al. Pregnancies and children after intracytoplasmic sperm injection attempt at the department of obstetrics and gynecology in Ljubljana. Retrospective study after the birth of 101 children. *Zdrav Vestn* 2000; 69: 67-73.
4. Monset-Couchard M, de Betmann O, Relier JP. Neonatal outcome from assisted reproductive technologies. *Gynaecol Perinatol* 1998; 7: 59-62.
5. Martikainen H, Tiitinen A, Tomás C et al. One versus two embryo transfer after IVF and ICSI: a randomized study. *Hum Reprod* 2001; 16: 1900-3.
6. Gerris J, de Neubourg D, Mangelschots K, van Royen E, van der Meerse M, Valkenburg M. Prevention of twin pregnancies of in-vitro fertilization or ICSI based on strict criteria: a prospective randomized clinical trial. *Hum. Reprod* 1999; 14: 2581-7.
7. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000; 73: 1155-8.
8. Yovich JL, Stanger JD, Gravaug A et al. Monozygotic twins from in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984; 41: 833-7.
9. Tarlatzis BC, Qublan HS, Sanopoulou T, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Increase in the monozygotic twinning rate after intracytoplasmic sperm injection and blastocyst stage embryo transfer. *Fertil Steril* 2002; 77: 196-8.
10. Alikani M, Noyes N, Cohen J, Rosenwaks Z. Monozygotic twinning in human is associated with the zona pellucida architecture. *Hum Reprod* 1994; 9: 1318-21.
11. Rijnders PM, van Os HC, Jansen CAM. Increased incidence of monozygotic twinning following the transfer of blastocysts in human IVF/ICSI. *Fertil Steril* 1998; 70: Suppl 1: 15S-16S.
12. Milki AA, Jun SH, Hinckley MD, Behr B, Giudice LC, Westphal LM. Incidence of monozygotic twinnings with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer. *Fertil Steril* 2003; 79: 503-6.