

Strokovni prispevek/Professional article

VPLIV IZBIRE ZARODKOV, SPOČETIH Z VNOSOM SEMENČICE V CITOPLAZMO JAJČNE CELICE, NA VGNEZDITEV ZARODKOV PO PRENOSU V MATERNICO

INFLUENCE OF EMBRYO SELECTION AFTER INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION ON IMPLANTATION AFTER EMBRYOTRANSFER

Veljko Vlaisavljevič, Borut Kovačič, Vida Gavrić-Lovrec, Milan Reljič, Vidka Petrovič, Mojca Čížek-Sajko, Vilma Kovač

Oddelek za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo, Služba za ginekologijo in perinatologijo, Splošna bolnišnica, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

Prispelo 2001-09-03, sprejeto 2001-12-03; ZDRAV VESTN 2002; 71: Supl. I: 7-11

Ključne besede: kakovost zarodkov; število zarodkov; prenos zarodkov; blastociste; zanositev

Izvleček – Izhodišča. Namen raziskave je bil analizirati rezultate postopka ICSI glede števila in kakovosti zarodkov, ki smo jih prenesli v maternico tri ali pet dni po oploditvi.

Metode. Analizirali smo izid prenosa 1498 zarodkov tretji dan po oploditvi in prenosa 364 pet dni starih zarodkov (blastocist). Primerjali smo delež vgnezdenih zarodkov glede na trajanje inkubacije, število in kakovost prenesenih zarodkov. Razlike v stopnji zanositve med posameznimi skupinami smo ugotavljali s testom hi-kvadrat.

Rezultati. Vgnezdilo se je 21,3% (320/1498) zarodkov, ki smo jih prenesli v maternico 3 dni po oploditvi. Ob prenosu enega, dveh, treh ali štirih zarodkov se je stopnja zanositev povečevala od 20,0%, 22,1%, 54,5% na 59,0%. V skupini z enim ali dvema zarodkoma za prenos se stopnja zanositve v odvisnosti od kakovosti zarodkov ni spreminjala statistično značilno. Prenos vsaj enega zarodka dobre kakovosti med tremi ali štirimi prenesenimi zarodki je statistično pomembno vplival na stopnjo enoplodne zanositve (37,8% oz. 41,3%). Stopnja večplodnih nosečnosti je ostala nizka (18,1% oz. 16,6%). Stopnja dvoplodnih zanositev ob prenosu dveh zarodkov dobre kakovosti je bila 66,6% (8/12). S povečevanjem deleža dobrih zarodkov za prenos na tri ali štiri se je povečeval delež zanositev (55,5% oz. 75,8%), še bolj pa odstotek večplodnih vgnezditev (43,1% oz. 54,5%). Po prenosu 5 dni starih zarodkov (blastocist) se je vgnezdilo 37,3% (136/364) zarodkov. Ob prenosu ene blastociste je bila stopnja zanositve 36,2% (21/58), ob prenosu dveh blastocist pa je zanosilo 55,7% (98/176) žensk. Delež dvoplodnih nosečnosti ob prenosu dveh blastocist je bil 38,7%.

Zaključki. Prenos zarodkov v stopnji blastociste statistično pomembno poveča uspešnost postopka zunajtelesne oploditve. S prenosom dveh blastocist ostane delež dvoplodnih zanositev enako visok kot po prenosu treh kakovostnih zarodkov tretji dan po oploditvi.

Key words: embryo quality; embryo number; embryotransfer; blastocysts; pregnancy rate

Abstract – Background. The aim of our study was to analyse the results of ICSI procedure with respect to the number of embryos transferred 3 or 5 days after fertilization.

Methods. The outcome of 1498 day 3 embryo transfers and 364 day 5 embryo (blastocyst) transfers was analysed. The percentage of implanted embryos was compared with regard to the number and quality of embryos transferred. Differences in pregnancy rate between the groups were established with the chi-square test.

Results. Implantation occurred in 21.3% (320/1498) of embryos transferred to the uterus on day 3 post fertilization. In the transfer of one, two, three or four embryos, the pregnancy rate increased from 20.0% to 22.1%, 54.5% and 59.0% respectively. In the group with one or two embryos for transfer, the pregnancy rate did not change statistically significantly in correlation with embryo quality. The twin pregnancy rate after the transfer of two good quality embryos was 66.6% (8/12). The presence of at least one good quality embryo among three or four embryos transferred had a statistically significant effect on the singleton pregnancy rate (37.8% and 41.3%). The rate of multiple pregnancies remained low (18.1% and 16.6%). Increasing the percentage of good quality embryos for transfer to three or four had a greater effect on the percentage of multiple implantations (43.1% and 54.5%) than on the pregnancy rate (55.5% and 75.8%). After the transfer of 5-day-old embryos (blastocysts), implantation occurred in 37.3% (136/364) of embryos. After the transfer of one blastocyst, the pregnancy rate was 36.2% (21/58), after the transfer of two blastocysts it was 55.7% (98/176). The twin pregnancy rate after the transfer of two blastocysts amounted to 38.7%.

Conclusions. The transfer of blastocyst stage embryos results in a statistically significant increase in the success of the ICSI procedure. In the transfer of two blastocysts, the rate of twin pregnancies remains equally high as in the transfer of three good quality embryos on the third post fertilization day.

Uvod

Številne raziskave, ki razčlenjujejo razloge za različno uspešnost postopkov zunajtelesne oploditve, ugotavljajo odvisnost stopnje zanositve po prenosu zarodkov v maternico (ET – embriotransfer) od številnih dejavnikov. Najpogostejši med njimi so starost ženske, vzrok neplodnosti, način spodbujanja ovulacije oz. priprave za punkcijo ter pogoji kultiviranja jajčnih celic in zarodkov v laboratoriju za IVF (1). Pri postopku zunajtelesne oploditve z mehničnim vnosom oziroma vbrizganjem semenčice v citoplazmo jajčne celice (ICSI) imamo pogosto opravka le z neplodnostjo moškega, ženska pa je zdrava. Pri tem na uspešnost postopka ne vplivajo število semenčic, morfološke značilnosti semenčice ali način njihove pridobitve (iz ejakuliranega semena ali iz bioptičnega materiala testisa) (2). Na rezultat postopka pomembno vpliva izkušnost laboratorija v tehniki ICSI (3–5).

V maternico prenesemo več zarodkov, ker v tem primeru pričakujemo večjo verjetnost, da se bo vsaj eden od njih vgnezdil. Zaradi nenehnega izboljševanja rezultatov zunajtelesne oploditve in globalnega naraščanja števila večplodnih nosečnosti po zdravljenju s tehnikami zunajtelesne oploditve so centri za zunajtelesno oploditev nenehno zmanjševali število prenesenih zarodkov ob ET. Vzrok je bilo veliko število nezaželenih večplodnih nosečnosti po prenosu večjega števila zarodkov (6, 7). Od prej splošno sprejetega načela o prenosu štirih zarodkov v prvi polovici 90. let priporočajo danes najpogosteje prenos le treh ali dveh zarodkov (8–10). Redki centri se odločajo za prenos le enega zarodka v maternico, in še to le v skupini z visokim tveganjem za nastanek večplodne nosečnosti (11). Prospektivne raziskave, ki bi potrdila enako uspešnost takšnega pristopa tudi pri neselekcioniirani skupini žensk, še ni.

Ocenjevanje morfološke ustreznosti zarodka (»kakovosti zarodka«) je tako postalo izjemno pomemben del postopka, saj izbor najprimernejšega zarodka izmed mnogih neposredno vpliva na uspešnost postopka. Med postopkom zunajtelesne oploditve je mogoče opazovati izgled jajčne celice in razvoj zarodka v vseh fazah do prenosa v maternico. Na osnovi morfoloških meril, ki vključujejo oceno izgleda in hitrosti delitve blastomer ter prisotnost in delež delcev citoplazemskih vključkov med blastomerami, lahko izbiramo med zarodki tiste z večjim potencialom za vgnezditev (12, 13). Zarodki, ki so po morfološkem izgledu slabše ocenjeni, tudi imajo možnost za vgnezditev, vendar se to zgodi redkeje kakor pri boljše ocenjenih zarodkih (14). To lastnost imajo tudi zarodki, nastali v *in vivo* pogojih, kar napeljuje na sklep, da je prisotnost zarodkov slabe kakovosti eden od načinov uravnavanja človekove sposobnosti za zanositev (15).

Podaljšan razvoj zarodkov v gojišču 5 dni po oploditvi, ko leti dosežejo stopnjo blastociste, omogoča izbiro najbolj vitalnih zarodkov. V maternico je zato možno prenesti manjše število zarodkov. Toda tudi v tem primeru se le redko odločajo za prenos enega samega zarodka pri vseh ženskah (16–18). Izjema so le postopki zunajtelesne oploditve v naravnem ciklusu, kjer običajno dozori le ena jajčna celica, na kateri opravimo postopek ICSI.

V naši raziskavi smo analizirali stopnjo implantacije po prenosu zarodkov v ciklih ICSI. Primerjali smo izide prenosa zarodkov drugi ali tretji dan po oploditvi z rezultati prenosa peti dan po oploditvi. Analizirali smo vpliv števila in kakovosti zarodkov na izid postopka ICSI. Uspešnost postopka smo ocenjevali s stopnjo zanositev na cikel s punkcijo foliklov ter s stopnjo zanositev na prenos zarodka.

Metode dela

Uspešnost postopka ICSI smo analizirali na neselekcioniirani skupini žensk, ki so opravile postopek med 1. 1. 1995 in 31. 6.

2000. Vse so opravile postopek v ciklu ICSI, ki smo ga spodbujali z gonadotropini ali kombinacijo agonistov gonadotropin sproščajočega hormona in gonadotropini. Analizirali smo le cikle ICSI, pri katerih smo za vbrizganje uporabili semenčice, izolirane iz semenskega izliva. Oploditev z zamrznjenim semenom ali s semenčicami iz punktata testisa ali bioptičnega materiala testisa nismo zajeli v raziskavo.

O načinu vodenja ciklov med spodbujanjem ovulacije (19) in o laboratorijskem delu postopka (20) smo že poročali.

Jajčne celice smo po vnos semenčice v citoplazmo gojili v kapljici enostavnega gojišča MediCult (Danska) v petrijevki, prekriti s parafinskim oljem. Oploditev (fertilizacijo) smo ocenjevali 16 do 18 ur po vbrizganju semenčice v jajčno celico. Za normalen izvid oploditve smo upoštevali le prisotnost dveh pronukleusov v citoplazmi jajčne celice. Jajčnih celic, pri katerih smo opazili razvoj le enega pronukleusa (partenogenetsko aktivirane jajčne celice), in tistih s tremi pronukleusi (dignične jajčne celice) nismo uporabili v kliničnem delu. Drugi dan po punkciji (dan +2) smo ocenili razvoj zarodkov. V primerih, ko smo za embriotransfer imeli na voljo več kot štiri zarodke, smo kultiviranje podaljšali še za en dan (dan +3) v gojišču M2 (MediCult, Danska). Do leta 1997 smo prenos zarodkov v maternico opravili dva dni po osemenitvi jajčne celice. V maternico smo prenesli največ po štiri zarodke. Po letu 1997 smo v maternico prenašali največ po tri zarodke. Od decembra 1999 smo prenos zarodkov opravili 5 dni po aspiriranju in v maternico prenašali enega ali le dva zarodka. Pri tem smo zarodke gojili v sekvencijskem gojišču BlastAssist (MediCult, Danska). Zarodke smo ocenjevali na invertirani mikroskopu Olympus, opremljenem s Hoffmanovo optiko, pri 200- in 400-kratni povečavi. Ocenjevali smo število in enakomernost blastomer ter prisotnost in količino citoplazmatskih vključkov brez jeder (fragmentov) med blastomerami. Vsak zarodek smo ocenili z oceno od 1 do 4 (1 – brez fragmentov, 2 – do 20% fragmentacij, 3 – med 20% in 50% fragmentacij, 4 – več kot 50% fragmentacij) in z »a« ali »b« enakomernosti blastomer. Kot dobre zarodke smo ocenili tiste, ki so dobili oceno od 1a do 2b.

Na dan 5 smo zarodke ocenjevali z ocenami od 1 do 5 glede na delež blastocela znotraj celične mase:

- 1 – manj kot polovica,
- 2 – polovica,
- 3 – več kot polovica,
- 4 – popolnoma razprta (ekspandirana) blastocista,
- 5 – razprta blastocista z začetnimi znaki levitve.

Zarodke smo prenesli v maternico z mehkim katetrom (Cook Australia ali Labotect, Nemčija). Prenos smo skušali opraviti atravmatsko, zarodke pa odložiti en centimeter pod materničnim svodom.

Po prenosu zarodkov so vse ženske dobile terapijo za podporo lutealne faze cikla: 30 mg didrogesterona (Dabroston, Duphare, Nizozemska) ali 600 mg progesterona (Utrogestan, Asta Medica, Nemčija). Nekatero med njimi so 7. dan po punkciji dobile 1500 IE horionskega gonadotropina (Pregnyl, Organon, Nizozemska). Osebe, starejše od 40 let, so v lutealni fazi jemale tudi etinylestradiol 2 mg (Progynova, Scherring, Nemčija) in 0,1 g aspirina (Bayer, Nemčija). Analizo beta hCG v krvi so opravile 16 dni po prenosu zarodkov. V primeru pozitivnega testa so nadaljevale z lutealno podporo še 14 dni. Tri tedne po prenosu zarodkov smo z vaginosonografijo ugotavljali število implantiranih zarodkov in število gestacijskih mešičkov. Teden dni kasneje smo ugotavljali obstoj srčne akcije, s čimer smo potrdili delež vitalnih nosečnosti.

Statistična analiza

Test hi-kvadrat smo uporabili za izračun statistične značilnosti med kvantitativnimi spremenljivkami. Analizo vseh podatkov smo opravili s programom Statistica Statsoft (ZDA).

Rezultati

Analizirali smo sposobnost implantacije zarodkov po prenosu 2 ali 3 dni po oploditvi in 5 dni po oploditvi, ko dosežejo stopnjo blastociste.

V prvi skupini smo prenesli v maternico 1498 zarodkov po dvo- ali tridnevnom kultiviranju zunaj telesa. Tri tedne po prenosu zarodkov smo ugotavljali z ehografsko preiskavo število vgnezdjenih zarodkov. Vgnezdilo se je 320 zarodkov (21,3%). Stopnja vgnezditve zarodkov je bila odvisna od števila prenesenih zarodkov. V primerih, ko smo prenesli v maternico le en zarodek, stopnja vgnezditve (v tem primeru tudi zanositve) ni presegla 22,9%. V primeru, ko smo prenesli v maternico 2 zarodka, smo zabeležili stopnjo zanositev med 20,7% in 26% ne glede na morfološki izgled zarodka. V primerih, ko smo v maternico prenesli več kot 2 zarodka, smo zabeležili višje stopnje zanositev (44%–75%). Najnižjo stopnjo implantacije v tej skupini žensk smo vedno zabeležili takrat, ko smo prenesli v maternico le en morfološko dober zarodek. S povečevanjem števila dobrih zarodkov v kohorti zarodkov, namenjenih embriotransferju, je rasel tudi delež večplodnih nosečnosti. Delež večplodnih vgnezditve je bil pri prenosu dveh zarodkov 36,0% (9/25), treh zarodkov 38,4% (50/130) ter štirih zarodkov 50,6% (42/83). 29 (33,7%) zanositev, pri katerih smo opazili več gestacijskih mešičkov, v naslednjih tednih ni razvilo enakega števila plodov ali pa je prišlo do spontanega odmrtja enega ali več zarodkov ter nadaljevalo s razvojem manjšega števila plodov. 15 (14,8%) večplodnih zanositev je končalo s spontanim splavom. Izmed 86 ciklusov, pri katerih je prišlo do vgnezditve več plodov in so se končali s porodom, smo pri 19 (22,1%) ciklusih opazili spontano redukcijo števila zarodkov v prvih 12. tednih nosečnosti. Pri 11 večplodnih nosečnostih smo opravili selektivno prekinitev nosečnosti med 6. in 7. tednom gestacije in zmanjšali število zarodkov na dva. Rodilo se je 62 parov dvojčkov in 5 trojčkov (tab. 1).

V postopku prenosa zarodkov na razvojni stopnji blastociste smo prenesli v maternico 364 zarodkov. Vgnezdilo se jih je 136 (37,3%). Tudi v primeru prenosa blastocist smo opazili, da je bil delež zanositev odvisen od deleža dobrih zarodkov med tistimi, ki so namenjeni prenosu v maternico. Prenos blastociste slabe kakovosti je imel za posledico tudi nižjo stopnjo vgnezditve (le s 15,8-odstotno stopnjo zanositve). Ob prenosu enega dobrega zarodka (blastociste) v maternico smo zabeležili 46,1% vgnezditve. Med njimi je bila tudi ena dvoplodna nosečnost (4,3% vseh zanositev s prenosom enega zarodka). Pri prenosu dveh zarodkov kakovost zarodkov ni statistično pomembno vplivala na izid postopka, saj smo beležili med 64,3% in 75,7% zanositev ne glede na to, ali je bila dobre kakovosti ena, obe ali nobena od prenesenih blastocist. Med njimi je bilo 38,7% (38/98) večplodnih nosečno-

Tab. 1. Stopnja vgnezditve zarodkov, spočetih z ICSI, glede na število in kakovost zarodkov ob 557 prenosih drugi dan po oploditvi.

Tab. 1. Implantation rate in 557 ICSI embryotransfers calculated per embryo number and embryo quality on day 2 after sperm injection.

Število zarodkov ob prenosu (ciklusov)	Število prenosov (število zarodkov)	Število dobrih zarodkov/vsi preneseni zarodki	Zanositev na prenos (%)	Večplodne nosečnosti (% od zanositev)		
				Multiple pregnancies (% pregnancies)		
Embryos per transfer (cycles)	Embryo-transfers (embryos)	Good quality embryos/embryos transferred	Pregnancy per transfer (%)	dvojčki twins	trojčki triplets	četverčki quadruplets
1 zarodek	32 (32)	0/1	5 (15,6)			
1 embryo	48 (48)	1/1	11 (22,9)			
2 zarodka	23 (46)	0/2	6 (23,0)	1 (16,6)		
2 embryos	32 (64)	1/2	7 (21,9)			
(113)	58 (116)	2/2	12 (20,7)	8 (66,6)		
3 zarodki	12 (36)	0/3	3 (25,0)			
3 embryos	25 (75)	1/3	11 (44,0)	1 (9,1)	1 (9,1)	
(244)	36 (108)	2/3	24 (66,0)	5 (20,8)	2 (8,3)	
	171 (513)	3/3	95 (55,5)	30 (31,6)	11 (11,6)	
4 zarodki	13 (52)	0/4	6 (46,1)	1 (16,6)		
4 embryos	16 (64)	1/4	6 (37,5)	1 (16,6)		
(140)	25 (112)	2/4	14 (56,0)	8 (57,1)	2 (14,3)	
	28 (232)	3/4	13 (46,4)	5 (38,4)		1 (7,6)
	58 (232)	4/4	44 (75,8)	10 (22,7)	10 (22,7)	4 (9,1)
Nosečnosti / Pregnancies			257	70 (27,2)	26 (10,1)	5 (1,9)
Porodi / Deliveries			193	62 (32,1)	5 (2,5)	0 (0,0)
Splav, GEU / Abortion, ectopic			64 (24,9)			
Nosečih na prenos / Pregnancies per transfer			44,5%			
Porodov na prenos / Deliveries per transfer			33,4%			

Tab. 2. Stopnja vgnezditve zarodkov, spočetih z ICSI, glede na število in kakovost zarodkov ob prenosu 5. dan po oploditvi.

Tab. 2. Implantation rate in 234 ICSI embryotransfers calculated per embryo number and embryo quality on day 5 after sperm injection.

Število zarodkov ob prenosu (ciklusov)	Število prenosov (blastocist)	Število dobrih zarodkov/vsi preneseni zarodki	Zanositev na prenos (%)	Večplodne nosečnosti (% od zanositev)		
				Multiple pregnancies (% pregnancies)		
Embryos per transfer (cycles)	Transfers (blastocysts)	Good quality embryos/embryos transferred	Pregnancy per transfer (%)	dvojčki twins	trojčki triplets	četverčki quadruplets
1 zarodek	19 (19)	0/1	3 (15,8)	1 (4,8)		
1 embryo	39 (39)	1/1	18 (46,1)			
(58)						
2 zarodka	28 (56)	0/2	13 (64,3)	3 (23,1)		
2 embryos	37 (74)	1/2	28 (75,7)	8 (28,6)	1 (3,5)	
(176)	88 (176)	2/2	57 (64,8)	27 (47,4)		
Nosečnosti / Pregnancies			119	39 (32,7)	1 (0,8)	
Porodi / Deliveries			92	23 (25,0)	1 (1,1)	
Splav, GEU / Abortion, ectopic			27 (22,6)			
Nosečih na prenos / Pregnancies per transfer			56,5			
Porodov na prenos / Deliveries per transfer			39,3			

sti. Tudi med njimi smo zabeležili eno triplodno nosečnost z enojajčnimi dvojčki (tab. 2).

Razpravljanje

Prenos večjega števila zarodkov v maternico omogoča večjo verjetnost zanositve, ker pričakujemo, da se bo vsaj eden od zarodkov vgnezdil. Ob prenosu več zarodkov v maternico prihajata v nasprotje dva interesa: pričakovanje ženske, ki si želi zanositev ne glede na tveganje večplodne nosečnosti, in pravica otroka po najmanj tveganem poteku nosečnosti in porodu, torej enoplodni nosečnosti. Zato je pomembno, da se že pred transferjem dogovorimo o številu zarodkov, ki jih bomo vrnili v maternico.

Ameriško združenje za reproduktivno medicino (8) priporoča prenos treh zarodkov pri ženskah z zelo dobro prognozo, ki so mlajše od 30 let. Pri tistih z dobro prognozo, starih od 30 do 40 let, priporočajo prenos do štirih dobrih zarodkov. Pri tistih ženskah, ki so starejše od 40 let in imajo številne neuspešne poskuse zanositve z biomedicinsko pomočjo, ne priporočajo prenosa več kot petih zarodkov. Omejitve na prenos treh zarodkov ne upoštevajo individualnih značilnosti vsakega para pri oceni verjetnosti za vgnezditev zarodka. Nasprotno temu Angleško združenje za plodnost (9) priporoča prenos največ treh zarodkov v maternico. Menijo, da pri ženskah, starejših od 38 let, ki imajo nižjo sposobnost zanositve, pomeni prenos treh zarodkov še vedno določeno tveganje za triploidno nosečnost, čeprav je tveganje za trojčke pri 40-letni ženski 4,6-krat nižje kot pri ženski, stari 30 do 35 let.

Po podatkih angleškega registra v centrih, kjer opravijo prenos 2 zarodkov v manj kot 15% vseh postopkov zdravljenja, lahko pričakujejo dvojčke v 28% in trojčke v 5% vseh zanositev. V tistih centrih, kjer opravijo prenos dveh zarodkov v več kot 50% vseh postopkov zdravljenja, se le minimalno zmanjša verjetnost za dvoplodno nosečnost (24%), nekaj več pa za triploidno nosečnost (5%) (21).

Med mnogimi dejavniki, ki vplivajo na izid ICSI, je starost najpomembnejša. Vpliv staranja na izid postopka se zrcali že na številu in kakovosti jajčnih celic ter v večji stopnji spontanih splavov. Staranje ne vpliva na uterus oz. njegovo pripravljenost za vgnezditev.

Starejše ženske lahko pričakujejo manjše število aspiriranih jajčnih celic, manj oplojenih jajčnih celic in manj zarodkov (22). Tako se pri starejših skupinah žensk zmanjšujejo tudi možnosti izbire dobrih zarodkov za transfer.

Vgnezditvena (implantacijska) sposobnost zarodkov in preživetje zarodkov sta pri starejših ženskah manjša, kar se kaže v zmanjšani vgnezditvi zarodkov (število implantiranih zarodkov na število prenesenih zarodkov) (23, 24).

Pri zunajtelesni oploditvi je izbor najbolj vitalnega zarodka, z največ možnostmi za vgnezditev, najpomembnejši del postopka. Zato je dolgo veljalo, da je bolje prenesti v maternico večje število zarodkov, da bi se vsaj eden ugnezdil. Posledica tega je bil visok delež večplodnih nosečnosti med ženskami, zdravljenimi s tehnikami oploditve z biomedicinsko pomočjo. Leta ni v neposrednem sorazmerju s stopnjo vgnezditve, saj od prvotnega števila vgnezdenih zarodkov velik delež spontano odmre in nosečnost se nadaljuje z manjšim številom plodov. Blumenfeld in sod. (25) poročajo, da se število plodov pri večplodni nosečnosti spontano zmanjša v 43% do 78% nosečnosti. V primeru, ko je večplodna nosečnost s trojčki ali četverčki nesprejemljiva, ostaja kot možna rešitev tudi transvaginalno aspiriranje nadštevilnih gestacijskih mešičkov in redukcija njihovega števila na dva (26). V primeru nezaželene triploidne nosečnosti imajo takšen postopek za opravičen tudi strokovna združenja FIGO, BFS, AFS (8, 9), ob upoštevanju možnosti, da ženska zgubi nosečnost v 15–17%.

Delež večplodnih nosečnosti je med različnimi evropskimi centri kljub enakemu številu prenesenih zarodkov različen (5). Mnogi centri skušajo izboljšati rezultat s podaljšanim kultiviranjem in boljšo selekcijo zarodkov za prenos.

Stopnja fragmentacije zarodka je najpomembnejši kazalec njihove kvalitete (27, 28). Hitrost delitev blastomer je naslednji kazalec kakovosti zarodka (29). Zarodki, ki se delijo počasneje, imajo tudi manjšo možnost za vgnezditev (30). V naši analizi podatkov smo upoštevali stopnjo fragmentacije zarodkov in hitrost delitve.

Ocena kakovosti zarodka samo na osnovi morfološkega izgleda je nezanesljiva. Tudi morfološko neoporečni zarodki so lahko nosilci kromosomskih nepravilnosti. To je še posebej izraženo pri starejših ženskah.

Kakovost zarodkov tudi ni vedno vezana samo za laboratorijske pogoje njihovega razvoja. Vitalnost zarodka je v neposre-

dni zvezi s kakovostjo jajčne celice, iz katere je zarodek nastal, le-ta pa od procesov njene zoritve oz. od razvoja folikla v času zorenja (31, 32). V kohorti aspiriranih jajčnih celic so vedno tudi celice z različnimi stopnjami jedrne in citoplazmatske zrelosti ne glede na uporabljen protokol spodbujanja rasti foliklov. Pomemben dejavnik, ki vpliva na selekcijo zarodkov, je velikost kohorte zarodkov (33). V primeru, da je zarodkov več kot 5, je verjetnost, da dobimo dobre zarodke za prenos, bistveno večja. To dejstvo ima večji vpliv na stopnjo zanositve kot samo število prenesenih zarodkov (34).

Dobra selekcija zarodkov in prenos majhnega števila zarodkov sta pomembna zaradi zmanjševanja tveganja za nastanek večplodne nosečnosti. Iz naših rezultatov je razvidno, da lahko le prenos enega zarodka v maternico reši ta problem, čeprav lahko tudi takrat pričakujemo pojavljanje (enojajčnih) dvojčkov. Ob prenosu dveh zarodkov lahko še vedno pričakujemo dvoplodno nosečnost vsaj v tretjini primerov.

Z izbiro le enega od zarodkov dva dni po oploditvi so možnosti za izbor najbolj ustreznega zarodka majhne, zato bo stopnja zanositev na prenos zarodka nizka. V tem obdobju je razvoj zarodka odvisen še od maternalne transkripcije in ne od aktiviranja lastnega genoma. Razen tega se zarodki v tem obdobju zelo razlikujejo po potencialu, da se razvijejo v blastocisto, sposobno za vgnezditev. Večina med njimi ne bo preživela vseh faz razvoja od dvoceličnega zarodka do stadija razprte blastociste ali celo stadija leveče se blastociste, ko zarodek zapusti ovojnico (zono pelucido).

Prenos enega zarodka v maternico drugi dan po osemenitvi jajčnih celic in zamrzovanje preostalih zarodkov je vprašljivo, saj zaradi nizke stopnje zanositev spodbujanje razvoja foliklov z gonadotropini ni smotno. V primeru, ko se odločimo za prenos le dveh zarodkov z namenom, da bi se izognili nastanku trojčkov, lahko pričakujemo odstotek zanositev v 30% do 40%, če pa zmanjšamo število prenesenih zarodkov na enega, se bo le-ta znižala na 14% (35). To pomeni, da bo od takšnega pristopa imelo korist le tistih 30% žensk s povečanim tveganjem za nastanek večplodne nosečnosti (dvojčkov), preostalih 70% pa se bo moralo sprijazniti s polovico manjšo uspešnostjo metode. Za tiste s povišanim tveganjem je nepotrebno tudi spodbujanje ovulacije, saj lahko enako stopnjo zanositve dosežemo tudi v primeru prenosa zarodka, nastalega iz jajčne celice nestimuliranega cikla (36). Takšen pristop bi imel dramatične posledice za ženske, starejše od 38 let, kjer je stopnja večplodnih nosečnosti izjemno nizka, kljub prenosu 3 ali 4 zarodkov. Tudi program prenosa odmrznjenih zarodkov je uspešen le, če smo za zamrzovanje selekcionirali zarodke dobre kakovosti. Tudi v tem primeru je smisel prenosa le enega zarodka zaradi nizke kumulativne stopnje zanositve vprašljiv. Poleg tega se poveča število prenosov in z njimi vezani stroški zdravljenja ter čustvene težave ob neuspehu slehernega prenosa zarodkov (37).

Selekcija zarodkov, ki temelji na upoštevanju njihove sposobnosti razvoja do blastociste in vitro, najboljše kaže njihov biološki potencial. Da bi dosegel ta stadij, je zarodek moral preiti več faz razvoja, od aktiviranja lastnega genoma, delitev blastomer, oblikovanja morule, razvoja blastociste in prve diferenciacije celic na celice trofektoderma in celice notranje celične mase.

Danes še ni jasnega mnenja o tem, ali je prenos zarodkov na stopnji blastociste enako dober za vse ženske. Nedvomno se njegova prednost takoj izniči v primeru prenosa treh blastocist, saj s tem tvegamo visok odstotek triploidnih nosečnosti (38). Vemo, da morfološki izgled zarodka drugi ali tretji dan po oploditvi nima dobre napovedne vrednosti za razvoj zarodka do stadija blastociste. Polovica morfološko dobrih zarodkov na dan 3 bo dosegla stopnjo blastociste, vendar bo enako stopnjo doseglo tudi 20% zarodkov, ki so na dan 3 ocenjeni kot slabi (39).

Naši rezultati na neizbrani skupini žensk so ohrabrujoči, saj omogočajo zanositev v odstotku, ki ga nismo dosegli z nobeno od do sedaj uporabljenih tehnik selekcije.

Tako smo v primeru prenosa le enega dobrega zarodka v stadiju blastociste dosegli 46% zanositev na prenos, kar je bilo le nekaj nižje kot takrat, ko smo prenesli dve blastocisti in dosegli 64% zanositev na prenos.

Zaključki

Kljub nedvomno velikemu pomenu večplodnih nosečnosti, ki nastanejo s prenosom zarodkov pri postopkih zunajtelesne oploditve, se le-tim ne moremo popolnoma izogniti. Povprečni delež večplodnih porodov po zanositvi s tehnikami oploditve z biomedicinsko pomočjo je v evropskih centrih 29,6% (25,8% dvojčkov, 3,6% trojčkov in 0,2% četverčkov) (40). Pojavnost večplodnih zanositev po IVF/ICSI je odvisna od različnih doktrin o številu zarodkov, ki jih prenesejo v maternico. V evropskih centrih prenesejo en zarodek le pri 11% ciklov. V 38% vseh ciklov oploditve z biomedicinsko pomočjo prenesejo tri zarodke in v 11% štiri zarodke (40). Kljub temu da je med srednje- in južnoevropskimi državami večina takšnih, kjer vrnejo 4 zarodke v dobri tretjini vseh ciklov zdravljenja, je za nas bolj sprejemljivo priporočilo in praksa nordijskih držav, kjer priporočajo prenos največ dveh zarodkov (40). Zaradi izjemnega napredka pri kultiviranju zarodkov v *in vitro* pogojih je nujno upoštevati priporočila za omejitev vnosa na največ dva zarodka pri vseh ženskah z visokim tveganjem za nastanek večplodne nosečnosti. Žal pri takšnem pristopu lahko odpravimo le delež triplodnih nosečnosti med vsemi večplodnimi.

Enak pristop tudi ni primeren za vse ženske, še posebej ne za tiste, starejše od 38 let. Selekcija zarodkov s podaljšanim kultiviranjem do stopnje blastociste izjemno poveča uspešnost prenosa zarodkov kljub omejitvi števila vrnjenih zarodkov na maksimalno dva zarodka. Zaradi velikega odstotka dvoplodnih nosečnosti med tistimi s prenosom dveh blastocist je pomembno selekcionirati tiste med njimi, ki so kandidatke za prenos le enega zarodka. Zaradi možnosti nastanka enojajčnih dvojčkov ni popolnoma izključena niti nepričakovana večplodna nosečnost kljub prenosu ene ali dveh blastocist. Za priporočilo o prenosu le ene blastociste vsem ženskam, ki vstopajo v program zunajtelesne oploditve, še ni medicinsko podprtih dokazov (EBM).

Literatura

- Janny L, Menezes YJR. Evidence for a strong paternal effect on preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 1994; 38: 36-42.
- Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995; 10: 1123-9.
- Vlaisavljević V, Kovačič B, Gavrić V. Important factors for establishing a successful program of intracytoplasmic sperm injection. In: *Intracytoplasmic sperm injection: Basic and clinical aspects. Book of abstracts, Serono Symposia S. A. Thessaloniki, Greece: Serono, 1996: 20-0.*
- Palermo GD, Schlegl PN, Colombero LT, Zaninovic N, Moy F, Rosenwaks Z. Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Hum Reprod* 1996; 10: 1023-9.
- Tarlatzis B. Report of the activities of the ESHRE task force on the intracytoplasmic sperm injection. In: Van Steirteghem A, Devroey P, Liebaers eds. *Genetics and assisted human conception. Oxford: Oxford University Press, 1996: 160-76.*
- Kodama H, Fuduka J, Karube H et al. Prospective evaluation of simple morphological criteria for embryo selection in double embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 1995; 10: 2999-3003.
- Devreker F, Emiliani S, Reveland P et al. Comparison of two elective transfer policies of two embryos to reduce multiple pregnancies without impairing pregnancy rates. *Hum Reprod* 1999; 14: 83-9.
- American Society for Reproductive Medicine. A Practice Committee Report: a committee opinion. Guidelines on number of embryos transferred 1998. *Hum Reprod* 1998; 13: 2669-70.
- British Fertility Society. Recommendations for good practice. Embryo transfer 1998. *Hum Reprod* 1998; 13: 2669-9.
- Templeton A. Avoiding multiple pregnancies in ART: Replace as many embryos as you like - one at a time. *Hum Reprod* 2000; 15: 1662-2.
- Vilks S, Tiitinen A, Hyden-Granskog C et al. Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risks of multiple birth. *Hum Reprod* 1999; 14: 2392-5.
- Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P et al. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod* 1987; 2: 705-8.
- Staessen C, Nagy YP, Liu J et al. The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. *Fertil Steril* 1992; 57: 626-30.
- Veeck L. Oocyte assessment and biological performance. *Ann NY Acad Sci* 1987; 541: 259-74.
- Sauer VM, Bustillo M, Rodi IA et al. In vivo blastocyst production and ovum yield among fertile women. *Hum Reprod* 1987; 2: 701-3.
- Huisman GJ, Fauser BCJM, Eijkemans MJC et al. Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture. *Fertil Steril* 2000; 73: 117-22.
- Milki AA, Fisch JD, Bahr B. Two-blastocyst transfer has similar pregnancy rates and a decreased multiple gestation rate compared with three-blastocyst transfer. *Fertil Steril* 1999; 72: 225-8.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000; 73: 1155-8.
- Vlaisavljević V, Kovačič B, Gavrić-Lovrec V, Reljić M. Simplification of the clinical phase of IVF and ICSI treatment in programmed cycles. *Int J Gynecol Obstet* 2000; 69: 135-42.
- Vlaisavljević V, Kovačič B. Naše prve izkušnje s tehniko direktnega vnosa semenčice v citoplazmo jajčne celice pri zdravljenju moške neplodnosti. *Zdrav Vestn* 1995; 64: 677-9.
- Human Fertilisation and Embryology Authority. Patients guide to donor insemination in IVF clinics. London: HFEA, 1997.
- Sharma V, Riddle A, Mason BA, Pampiglione J, Campbell S. An analysis of factors influencing the establishment of a clinical pregnancy in an ultrasound-based ambulatory in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1988; 49: 468-78.
- Hull MGR, Fleming CF, Hughes AO, McDermott A. The age-related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996; 65: 783-90.
- Van Kooij RJ, Looman CWN, Habbema JDF, Dorland M, te Velde ER. Age-dependent decrease in embryo implantation rate after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996; 66: 769-75.
- Blumenfeldt Z, Dirnfeldt M, Abramovici H et al. Spontaneous fetal reduction in multiple gestations assessed by transvaginal ultrasound. *Br J Obstet Gynecol* 1992; 99: 333-7.
- Vlaisavljević V, Borko E. Selective reduction after gamete intrafallopian transfer. *Int J Gynecol Obstet* 1991; 36: 59-61.
- Giorgetti C, Terriou P, Auquier P et al. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995; 10: 2427-31.
- Alikani M, Cohen J, Tomkin BA et al. Human embryo fragmentation in vitro and its implication for pregnancy implantation. *Fertil Steril* 1999; 71: 836-42.
- Edwards RG, Beard HK. Is the success of human IVF more a matter of genetics and evolution than growing blastocysts? *Hum Reprod* 1999; 14: 1-4.
- Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 91-148.
- Jones HW, Acosta A, Andrews M et al. The importance of the follicular phase to success and failure in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983; 440: 317-22.
- Gregory L. Ovarian markers of implantation potential in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1998; 13: Suppl 4: 117-32.
- Devreker F, Govaerts I, Bertrand E et al. The long-acting gonadotropin-releasing hormone analogues impaired the implantation rate. *Fertil Steril* 1996; 65: 122-6.
- Templeton A, Morris JK. Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vivo fertilization. *N Engl J Med* 1998; 339: 573-7.
- Gerris J, Van Royen E. A plea for single embryo transfer. *Hum Reprod* 2000; 15: 1884-8.
- Vlaisavljević V, Kovačič B, Reljić M, Gavrić-Lovrec V. Comparison of three different protocols for monitoring of follicle development in 587 unstimulated cycles for IVF and ICSI. *J Reprod Med* 2001, v tisku.
- Hernandez ER. Avoiding multiple pregnancies: sailing uncharted seas. *Hum Reprod* 2001; 16: 615-6.
- Milki AA, Hinckley MD, Fisch JD et al. Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril* 2000; 73: 126-9.
- Rijders PM, Jansen CAM. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 2869-73.
- Nigran A. More than 200,000 ART cycles annually in Europe's first report. *Organon IVF News* 2001; 12: 5-5.