

## SLOVENSKO DRUŠTVO ZA REPRODUKTIVNO MEDICINO

Strokovni prispevek/Professional article

## DVOPLODNA NOSEČNOST PO PRENOSU DVEH ZARODKOV

TWIN PREGNANCY AFTER THE TRANSFER OF TWO EMBRYOS

*Lili Bačer-Kermavner, Irma Virant-Klun, Brigita Valentinčič-Gruden, Jerneja Kmecl, Jožica Mivšek, Tomaž Tomaževič, Martina Ribič-Pucelj, Andrej Vogler, Eda Bokal-Vrtačnik, Branko Zorn, Sašo Drobnič, Bojana Pinter, Helena Meden-Vrtovec*

Laboratorij za OBMP, Ginekološka klinika, Klinični center, Šlajmerjeva 3, 1525 Ljubljana

Prispelo 2003-05-14, sprejeto 2003-06-19; ZDRAV VESTN 2003; 72: Supl. II: 69-72

**Ključne besede:** *dvoplodna nosečnost; blastocista; prenos zarodkov*

**Izvleček** – Izhodišča. *Delež dvoplodnih nosečnosti po prenosu dveh zarodkov v postopkih OBMP je visok, zato je bil naš namen ugotoviti delež dvoplodnih nosečnosti v odvisnosti od razvojne stopnje zarodka, starosti bolnic in vzrokih neplodnosti.*

**Metode.** *Retrospektivno smo analizirali 1222 postopkov oploditve z biomedicinsko pomočjo (OBMP). Ugotavljali smo stopnjo nosečnosti in delež dvoplodnih nosečnosti po prenosu dveh blastocist ali dveh manj razvitih zarodkov v maternico. Skupino s prenosom dveh blastocist smo razdelili v štiri starostne skupine, prav tako pa tudi v štiri skupine po vzrokih neplodnosti.*

**Rezultati.** *Po prenosu dveh zarodkov je bila stopnja zanositve po prenosu dveh blastocist statistično značilno višja kot po prenosu dveh manj razvitih zarodkov (45% vs. 9%), od tega je bilo dvoplodnih nosečnosti statistično značilno več po prenosu dveh blastocist kot po prenosu dveh manj razvitih zarodkov (18% vs. 5%). Vpliv starosti bolnic in prenos dveh blastocist na stopnjo zanositve in delež dvoplodnih nosečnosti je pri skupini ≤ 30 let (21%) in 31–34 let (20%) statistično značilno večji kot pri skupini starejših bolnic (35–38 let = 15,7%; 39 let in več = 9%). Pri prenosu dveh blastocist je bil delež dvoplodnih nosečnosti pri bolnicah z nepravilnostmi jajcevodov (21%) in z endokrinološkimi vzroki neplodnosti (24,5%) statistično značilno večji kot pri endometriozii (7%) in nepravilnostih maternice (12,5%).*

**Zaključki.** *Po prenosu dveh blastocist je delež dvoplodnih nosečnosti statistično značilno višji pri bolnicah z nepravilnostmi jajcevodov in endokrinološkim vzrokom neplodnosti in mlajših od 34 let. Pri vseh teh bolnicah bi se tveganju za dvoplodno nosečnost lahko izognili s prenosom enega samega zarodka – najrazvitejše blastociste.*

**Key words:** *twin pregnancy; blastocyst; embryo transfer*

**Abstract** – Background. *Twin pregnancy rates following the transfer of two embryos in in vitro fertilization (IVF) treatment are high. Therefore, the aim of this study was to evaluate twin pregnancy rates in regard to the developmental stage of the embryo, patient age, and cause of infertility.*

**Methods.** *A retrospective analysis involved 1222 IVF procedures. Overall pregnancy rates and twin pregnancy rates following the transfer of two blastocysts or two cleavage-stage embryos were assessed. The blastocyst group was divided into four age subgroups, and into four subgroups by the cause of infertility.*

**Results.** *After the transfer of two blastocysts or two cleavage-stage embryos the overall pregnancy rates (45% vs. 9%) and the twin pregnancy rates (18% vs. 5%) were significantly higher in the blastocyst group. The effects of patient age and the transfer of two blastocysts on the overall pregnancy and twin pregnancy rates were significantly greater in the subgroups of patients aged ≤ 30 years (21%) and 31–34 years (20%) than in older patients (35–38 years = 15.7%; ≥ 39 years = 9%). In the blastocyst group the twin pregnancy rate was significantly higher in patients with tubal (21%) and endocrinological causes of infertility (24.5%) than in patients with endometriosis (7%) and uterine malformations (12.5%).*

**Conclusions.** *After the transfer of two blastocysts twin pregnancy rates are significantly higher in patients with tubal factor or endocrinological causes of infertility younger than 34 years. In this population of women the risk of twin pregnancy can be avoided by the transfer of a single embryo – most developed blastocyst.*

## Uvod

V postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo (OBMP) so jajčniki bolnic spodbujeni s hormoni, tako da dobimo več jajčnih celic in zato tudi več zarodkov (1). Prenos 3 ali 4 zarodkov v maternico predstavlja večje tveganje večplodnih nosečnosti in s tem povezanih zapletov, zato je razvoj OBMP potekal v smer zmanjševanja števila zarodkov, ne da bi se zmanjšala možnost zanositve (2). Gojenje zarodkov zunaj materinega telesa se je z dveh dni podaljšalo na pet. Podaljšano gojenje zarodkov je postalo mogoče z boljšim poznavanjem razvoja zarodka, njegovih potreb in s tem povezanim razvojem industrijsko pripravljenih gojišč, ki zadovoljijo potrebe razvijajočega se zarodka (3, 4). Podaljšano gojenje več zarodkov iste bolnice pa nam omogoča tudi selekcijo najbolj kakovostnih zarodkov za prenos v maternico ali zamrzovanje (5). Najboljši kazalec biološke kakovosti zarodkov je razvoj do razvojne stopnje *blastociste* (sl. 1), to je zarodka s približno 100 celica-



Sl. 1. *Blastocista* (povečava 200-kratna; Laboratorij za OBMP, Ginekološka klinika, Klinični center Ljubljana).

Figure 1. *Blastocyst* (magnification  $\times 200$ ; IVF Laboratory, Department of Obstetrics and Gynecology., University Medical Centre Ljubljana).

mi. Zaradi boljše razvitosti in selekcije zarodkov je prenos 3 blastocist kmalu postal neprimeren, saj je tveganje večplodne nosečnosti, in s tem povezanih zapletov preveliko. Prehod na prenos 2 blastocist je odpravil nevarnost tveganja triplodne nosečnosti. Z uspešnim programom zamrzovanja lahko preostale blastociste shranimo za več let (6). Namen študije je bil ugotoviti število dvoplojnih nosečnosti po prenosu dveh zarodkov po 5 dneh gojenja v pogojih *in vitro*, v odvisnosti od razvojne stopnje zarodkov, starosti bolnic in vzrokov neplodnosti.

## Metode

Opravili smo retrospektivno študijo 1222 postopkov zunajtelesne oploditve, v katerih sta se razvila dva ali več zarodkov in smo v maternico prenesli 2 zarodka po podaljšanem, petdnevem gojenju do razvojne stopnje blastociste v zaporednih gojiščih (Blast Assist System, Medi-Cult, Danska). Postopke smo opravili v letih 2001 in 2002 na Ginekološki kliniki v Ljubljani. Zarodki vseh bolnic so bili gojeni na enak način. Jajčne celice smo takoj po identifikaciji in osamitvi iz tekočine folikula inkubirali v IVF gojišču Universal (MediCult, Danska) pri 37 °C in 5-odstotnem CO<sub>2</sub> v inkubatorju (HeraCell, Heraeus). Jajčne

celice smo oplodili z metodo klasične zunajtelesne oploditve (IVF) ali z neposrednim vnosom semenčice v citoplazmo jajčne celice (ICSI). Prvi in drugi dan gojenja so bili zarodki inkubirani v gojišču M1, od tretjega do petega dne pa v M2 gojišču. Na dan 5 smo ocenili razvojno stopnjo zarodkov (blastociste, morule, manjcelični - razvojno zaustavljeni zarodki) in



Sl. 2. *Morula* 5. dan po oploditvi (povečava 200-kratna; Laboratorij za OBMP, Ginekološka klinika, Klinični center Ljubljana).

Figure 2. *Morula*, day 5 (magnification  $\times 200$ ; IVF Laboratory, Department of Obstetrics and Gynecology., University Medical Centre Ljubljana).



Sl. 3. *Zarodek s šestimi blastomerami* 5. dan po oploditvi (povečava 200-kratna; Laboratorij za OBMP, Ginekološka klinika, Klinični center Ljubljana).

Figure 3. *Six-cell embryo*, day 5 (magnification  $\times 200$ ; IVF Laboratory, Department of Obstetrics and Gynecology., University Medical Centre Ljubljana).

dva najbolj razvita zarodka prenesli v maternico s pomočjo katetra Set TDT (Prodimed, Francija). Nosečnost je bila biokemično potrjena 15. dan po prenosu zarodkov s prisotnostjo hormona  $\beta$ HCG v krvi. Eno- ali dvo- plodna nosečnost je bila dokazana z ultrazvokom dva tedna po biokemični potrditvi nosečnosti.

Razpr. 1. *Dvoplodne nosečnosti po prenosu dveh blastocist ali dveh manj razvitih zarodkov.*

Table 1. *Twin pregnancy after embryo transfer of two blastocysts or two less developed embryos.*

	Razvojna stopnja zarodkov Developmental stage of embryos		
	Blastocisti (2) Blastocysts (2)	Manj razvita zarodka (2) Cleavage-stage embryos (2)	Skupaj Total
Povprečna starost bolnic Mean patient age	32,8 ± 4,3	33,6 ± 4,6	33,7 ± 4,5
Število prenešenih zarodkov No. of embryo transfers	764	458	1222
Število nosečnosti No. of pregnancies	344	40	385
Število dvoplodnih nosečnosti (%) No. of twin pregnancies (%)	61 (18)*a	2 (5)*b	63 (16)
Nosečnosti/prenos zarodkov Pregnancies/Embryo transfer	45%*a	9%*b	32%

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

Ugotavljali smo stopnjo nosečnosti in delež dvoplodnih nosečnosti po prenosu dveh popolnoma razvitih zarodkov ( $n = 764$ ) - blastocist (BL) (sl. 1), v primerjavi s prenosom dveh manj razvitih zarodkov - morul (sl. 2) ali manjceličnih, razvojno zaustavljenih zarodkov (sl. 3). Morule in manjcelične zarodke smo označili z < BL ( $n = 458$ ).

Ugotavljali smo vpliv starosti ženske na pojavnost dvoplodne nosečnosti. Bolnice smo razdelili v 4 starostne skupine: ≤ 30 let ( $n = 194$ ), 31-34 let ( $n = 252$ ), 35-38 let ( $n = 220$ ), in ≥ 39 let ( $n = 161$ ) in ugotavljali delež dvoplodne nosečnosti v vsaki od teh skupin. Poleg tega smo ugotavljali tudi vpliv ženskih vzrokov neplodnosti - nepravilnosti jajcevodov ( $n = 346$ ), endometrioze ( $n = 85$ ), hormonskih nepravilnosti ( $n = 122$ ) in nepravilnosti maternice ( $n = 205$ ) pri bolnicah, ki smo jim prenesli dve blastocisti, na pojavnost dvoplodne nosečnosti. Vzrokov moške neplodnosti nismo upoštevali.

S statističnim programom SPSS (Illinois Inc. ZDA) - Mann-Whitney U testom smo ugotavljali statistično značilnost razlik v deležu dvoplodnih nosečnosti. Razlike so bile statistično značilne pri  $p < 0,05$ .

## Rezultati

Vseh prenosov zarodkov v maternico je bilo 1222, pozitiven test nosečnosti je bil v 385 primerih; to pomeni 32-odstotno stopnjo nosečnosti na prenos zarodka. 63 (16%) nosečnosti je bilo dvoplodnih, vse preostale nosečnosti pa so bile enoplodne.

Po prenosu dveh blastocist ( $n = 764$ ) je bilo 344 nosečnosti, kar pomeni 45-odstotno stopnjo nosečnosti na prenos zarodka. Od tega je bilo 61 (18%) dvo-

Razpr. 2. *Starost bolnic in dvoplodna nosečnost po prenosu dveh blastocist.*

Table 2. *Patient age and twin pregnancy after embryo transfer of two blastocysts.*

	Starost bolnic (leta) Patient age (years)			
	≤ 30	31-34	35-38	≥ 39
Prenos zarodkov Embryo transfer	194	252	220	161
Nosečnosti (%) Pregnancies (%)	99	109	89	44
Dvoplodne nosečnosti (%) Twin pregnancies (%)	21 (21)*a	22 (20)*b	14 (15,7)	4 (9)*c
Nosečnosti/prenos zarodkov (%) Pregnancy/embryo transfer (%)	51%*a	43%*b	41%	23%*c

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

Razpr. 3. *Ženski vzroki neplodnosti in dvoplodna nosečnost po prenosu dveh blastocist.*

Table 3. *Female causes of infertility and twin pregnancy after embryo transfer of two blastocysts.*

	Ženske indikacije neplodnosti Female causes of infertility			
	Nepravilnosti jajcevodov Tubal anomalies	Endometrioza Endometriosis	Hormonske nepravilnosti Hormonal disorders	Nepravilnosti maternice Uterine malformations
Povprečna starost bolnic Mean patient age	34,1 ± 4,2	32,9 ± 4,4	32,9 ± 4,4	33,4 ± 4,5
Prenosi zarodkov Embryo transfer	346	85	122	205
Nosečnosti Pregnancies	146	43	53	80
Dvoplodne nosečnosti (%) Twin pregnancies (%)	31 (21)*a	3 (7)*b	13 (24,5)*c	10 (12,5)*d
Nosečnosti/prenos zarodkov (%) Pregnancies/embryo transfer (%)	42%	51%	43%	39%

\*a, c / a, d / b, c / c, d - statistično pomembna razlika ( $p < 0,05$ )  
- statistically significant difference ( $p < 0,05$ )

Razpr. 4. *Ženski vzroki neplodnosti in dvoplodna nosečnost po prenosu dveh manj razvitih zarodkov.*

Table 4. *Female causes of infertility and twin pregnancies after the transfer of two cleavage-stage embryos.*

	Ženske indikacije neplodnosti Female causes of infertility			
	Nepravilnosti jajcevodov Tubal anomalies	Endometrioza Endometriosis	Hormonske nepravilnosti Hormonal disorders	Nepravilnosti maternice Uterine malformations
Povprečna starost bolnic Mean patient age	34,3 ± 4,9	32,7 ± 3,9	33,5 ± 4,6	34,1 ± 4,9
Prenosi zarodkov Embryo transfer	169	48	84	121
Nosečnosti Pregnancies	12	10	4	11
Dvoplodne nosečnosti (%) Twin pregnancies (%)	2 (17)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Nosečnosti/prenos zarodkov (%) Pregnancies/embryo transfer (%)	7%*a	21%*b	5%*c	9%*d

\*a, b / b, c / b, d - statistično pomembna razlika ( $p < 0,05$ )  
- statistically significant difference ( $p < 0,05$ )

plodnih nosečnosti. Po prenosu dveh manj razvitih zarodkov ( $n = 458$ ) je bilo le 40 nosečnosti (devetodstotna stopnja nosečnosti), od tega 2 (5%) dvoplodni nosečnosti (razpr. 1). Po prenosu dveh blastocist sta bili stopnja zanositve in delež dvoplojnih nosečnosti statistično značilno večja kot po prenosu dveh manj razvitih zarodkov ( $p < 0,05$ ).

Po prenosu dveh blastocist je bilo največ nosečnosti - 99 (stopnja nosečnosti 51%) pri bolnicah, mlajših od 30 let ( $n = 194$ ). Prav tako je bilo pri teh bolnicah največ dvoplojnih nosečnosti - 21 (21%). Najmanj nosečnosti - 44 (stopnja nosečnosti 23%) in tudi najmanj dvoplojnih nosečnosti - 4 (9%) je bilo pri bolnicah, starih 39 let in več (razpr. 2). Pri ženskah, mlajših od 30 let, in pri ženskah od 31 do 34 let sta bili stopnja nosečnosti in delež dvoplojnih nosečnosti statistično značilno večja ( $p < 0,05$ ) kot pri ženskah, starih 39 let ali več.

Po prenosu dveh blastocist se stopnja zanositve pri ženskah z nepravilnostmi jajcevodov, endometriozo, hormonskimi nepravilnostmi in nepravilnostmi maternice niso statistično značilno razlikovali (razpr. 3). Vendar smo ugotovili statistično značilno več dvoplojnih nosečnosti ( $p < 0,05$ ) pri bolnicah z nepravilnostmi jajcevodov (21%) in hormonskimi nepravilnostmi (24,5%) kot pri bolnicah z endometriozo (7%) in nepravilnostmi maternice (12,5%).

Po prenosu dveh manj razvitih zarodkov je bila stopnja nosečnosti pri vseh vrstah neplodnosti statistično značilno nižja kot po prenosu dveh blastocist. Pri ženskah z endometriozo je bila stopnja nosečnosti (21%) statistično značilno večja kot pri ženskah z nepravilnostmi jajcevodov (7%), s hormonskimi nepravilnostmi (5%) ali nepravilnostmi maternice (9%). Dvoplojne nosečnosti (17%) so se pojavile samo pri ženskah z nepravilnostmi jajcevodov (razpr. 4).

## Razpravljanje

Gojenje zarodkov do razvojne stopnje blastociste omogoča boljšo selekcijo zarodkov za prenos v maternico ali zamrzovanje, saj se do blastociste razvijejo le najvitalnejši zarodki. V nekaterih primerih se zarodki razvijajo počasneje in noben ne doseže razvojne stopnje blastociste. Pri teh bolnicah prenesemo manj razvite zarodke.

Spoznanja kažejo, da se povsem razvite blastociste in blastociste z dobro morfologijo bolje ugnezdijo v maternici kot manj razvite blastociste in blastociste s slabšo morfologijo (7). Pregled zadnjih dveh let je pokazal, da je po prenosu dveh blastocist bistveno večji delež dvoplojnih nosečnosti kot pri prenosu dveh manj razvitih zarodkov. Blastociste so najvitalnejši zarodki, ki se v maternici bolje ugnezdijo; stopnja zanositve je višja in tudi delež dvoplojnih nosečnosti je sorazmerno visok (18%). Prenos ene same blastociste v maternico bo primeren predvsem za bolnice s povsem razvitimi blastocistami dobre morfologije (8).

Pri pregledu starostne strukture bolnic, pri katerih smo prenesli 2 blastociste, smo ugotovili, da so si skupine po številu bolnic podobne, razlika pa je statistično značilna pri stopnji nosečnosti in deležu dvoplojnih nosečnosti. Pri bolnicah, starih 34 let ali manj, sta stopnja nosečnosti in delež dvoplojnih nosečnosti večja kot pri bolnicah, starih 39 let ali več.

Glede na ženske indikacije neplodnosti je tveganje dvoplojnih nosečnosti po prenosu dveh blastocist največje pri ženskah z nepravilnostmi jajcevodov in endokrinološkimi vzroki neplodnosti. Pri nepravilnosti maternice in endometriozii je verjetnost dvoplojne nosečnosti manjša.

Pri mlajših ženskah do 34. leta starosti z nepravilnostmi jajcevodov ali endokrinološkimi vzroki neplodnosti je veliko tveganje dvoplojne nosečnosti po prenosu dveh blastocist; pri teh bolnicah bi bil priporočljiv prenos ene same blastociste in zamrzitev nadštevilnih blastocist.

## Zaključki

Tveganje dvoplojnih nosečnosti pri prenosu dveh razvitih blastocist v maternico je pri ženskah, mlajših od 34 let, višje kot pri starejših ženskah. Tudi pri pregledu vzrokov neplodnosti smo opazili več dvoplojnih nosečnosti pri ženskah z nepravilnostmi jajcevodov in hormonskimi nepravilnostmi. Po prenosu dveh zarodkov, ki peti dan niso dosegli razvojne stopnje blastociste, je tveganje dvoplojnih nosečnosti manjše. Pojavili so se le pri ženskah z nepravilnostmi jajcevodov. Z boljšim poznavanjem razvoja zarodka in uspešno tehniko zamrzovanja bi mlajšim bolnicam z nepravilnostmi jajcevodov ali endokrinološkimi težavami prenašali v maternico samo eno blastocisto, ostale pa bi z zamrzovanjem shranili za kasneje.

## Zahvala

Zahvaljujemo se medicinskim sestram Oddelka za OMBP Ani Kisel-Vovko, Zvonki Gorše, Janji Tekavec, Blanki Gradišek, Andreji Peterlin, Gini Milič, Zdenki Mramor ter Jožici Šimonki in Majdi Štucin za vestnost in pomoč pri postopkih OBMP. Zahvaljujemo se tudi gospe Mojci Pirc, vodji Enote za raziskovanje, za pomoč in nasvete pri oblikovanju besedila.

## Literatura

1. Meden-Vrtovec H, Virant-Klun I, Tomaževič T et al. Program zunajtelesne oploditve na Ginekološki kliniki v Ljubljani. *Zdrav Vestn* 2001; 70: 89-95.
2. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagle YL, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 69: 84-8.
3. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod* 1998; 13: 169-77.
4. Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N, Wood C. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1998; 70: 1022-9.
5. Virant-Klun I, Veble A, Valentinčič B et al. Zamrzovanje in odmrzovanje zarodkov v programu zunajtelesne oploditve. *Zdrav Vestn* 1998; 67: 495-9.
6. Virant-Klun I, Tomaževič T, Bačar Kermavner L, Valentinčič-Gruden B, Mivšek J, Meden-Vrtovec H. Successful freezing and thawing of blastocysts cultured in sequential media. *Fertil Steril* 2003; 6, v tisku.
7. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000; 73: 1155-8.
8. Vilska S, Tiltinen A, Hyden-Grankog C and Hovatta O. Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth. *Hum Reprod* 1999; 14: 2392-5.