

Strokovni prispevek/Professional article

**KUMULATIVNA STOPNJA ZANOSITVE PO PRENOSU ENEGA ZARODKA: PRISPEVEK PROGRAMA VITRIFIKACIJE ZARODKOV****CUMULATIVE PREGNANCY RATE AFTER ELECTIVE SINGLE EMBRYOTRANSFER: THE IMPACT OF EMBRYO VITRIFICATION PROGRAMME***Borut Kovačič, Veljko Vlaisavljevič, Milan Reljič, Vida Gavrić-Lovrec, Vilma Kovač, Martin Ivec*

Oddelek za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

**Izvleček**

- Izhodišča** Večplodne nosečnosti so neželen pojav, ki spremlja postopek oploditve z biomedicinsko pomočjo (OBMP). Leta 2008 je Zavod za zdravstveno zavarovanje poskušal doseči zmanjšanje deleža večplodnih zanositev. Razširil je pravice zavarovank z dodatnima dvema ciklusoma na vsega skupaj šest ciklusov OBMP, a določil prenos enega zarodka optimalne kakovosti v prvih dveh postopkih OBMP pri ženskah, mlajših od 36 let. Namen raziskave je bil ugotoviti, kako takšen pristop, ki vključuje tudi prenos odmrznjenih zarodkov, vpliva na uspešnost postopkov OBMP.
- Metode** V letu 2008 bi v 47,4 % (287/605) ciklusov morali opraviti prenos enega optimalnega zarodka. Merilo optimalnosti je bilo za tri dni stare zarodke: vsaj 6 blastomer in manj kot 20 % fragmentov; in za blastociste: ekspandirani blastocel in ovalna notranja celična masa. Zarodke smo gojili do blastociste v 79,4 % (228/287) ciklusov. V 172 ciklusih smo nadštevne blastociste zamrznili po metodi vitrifikacije. Prenos odmrznjenih blastocist smo naredili pri 82 bolnicah, ki niso zanosile v svežem ciklusu. Analizirali smo delež zanositev po prenosu svežih in prenosu odmrznjenih zarodkov ter delež dvojčkov.
- Rezultati** En zarodek oziroma blastocisto smo prenesli v 58,9 % ciklusov, medtem ko smo se v preostalih 41,1 % primerov, kjer morfološki izgled zarodkov ni bil optimalen, odločili za prenos dveh zarodkov ali blastocist. V skupini, kjer smo prenesli en, večinoma tudi edini zarodek, je zanosilo 17,2 % žensk. Po prenosu ene blastociste je zanosilo 51,4 % žensk. Po prenosu dveh blastocist je bilo 40,9 % žensk nosečih, med njimi 50 % z dvojčki. Uspešnost po prenosu odmrznjenih blastocist je bila 23,2 %. Kumulativna stopnja zanositve v skupini žensk, pri katerih smo prenesli eno svežo blastocisto, in v naslednjih ciklusih opravili prenos še odmrznjenih blastocist, je znašala 62,9 %. Kumulativna stopnja zanositve v celotni skupini je bila 50,9 %, delež večplodnih nosečnosti pa le 14,4 %.
- Zaključki** Z omejevalno politiko prenosa več zarodkov v maternico v programu OBMP se je delež večplodnih nosečnosti znižal iz nekdanjih 40 % na 14,4 %.
- Ključne besede** oploditev in vitro; prenos enega zarodka; vitrifikacija blastocist; kumulativna stopnja nosečnosti; delež večplodnih nosečnosti

**Abstract**

- Background** Multiple pregnancies are undesired consequence of infertility treatment by in vitro fertilization (IVF). In 2008 the Health Insurance Institute of Slovenia strove for lowering the

**Avtor za dopisovanje / Corresponding author:**

Borut Kovačič, Oddelek za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

*number of multiple pregnancies. It widened the rights of patients by reimbursement of two additional IVF cycles, having totally six cycles reimbursed. But in women younger than 36, only one top-quality embryo in the first two IVF cycles has to be transferred. The aim of the study was to assess, how the new approach, including also the transfers of frozen-thawed embryos, influenced the IVF outcomes.*

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Methods     | <i>In year 2008, the transfer of one optimal embryo had to be done in 47.4 % (287/650) of IVF cycles. The criteria for optimality of early cleavage stage embryos were: at least 6 blastomeres and less than 20 % of fragmentation; and for blastocysts: expanded blastocoel and oval inner-cell-mass. Embryos were cultured to blastocysts in 79.4 % (228/287) of cycles. The surplus blastocysts were vitrified in 172 cycles. The transfer of devitrified blastocysts was performed in 82 patients, which did not conceive in fresh cycle. The pregnancy rate and twins rate after fresh transfers and after transfers of devitrified embryos were analyzed.</i>                                                                                                                                                                               |
| Results     | <i>Single embryo or blastocyst transfer was done in 58.9 % of women. In the remaining 41.1 % of cycles the embryos were morphologically not optimal and we decided for double embryo or blastocyst transfer. In the group in which a single and mostly the only embryo was transferred, only 17.2 % of women became pregnant. After the transfer of elective single blastocyst, 51.4 % of women conceived. After double blastocyst transfer, 40.9 % of patients conceived and 50 % of them had twins. The replacement of devitrified blastocysts was successful in 23.2 %. The cumulative pregnancy rate in group of cycles with single fresh blastocyst transfer, followed by transfers of devitrified blastocysts, was 62.9 %. The cumulative pregnancy and multiple pregnancy rate in the whole group was 50.9 % and 14.4 %, respectively.</i> |
| Conclusions | <i>By the policy of reduction the number of transferred embryos into the uterus in IVF programme, the multiple pregnancy rate decreased from previously 40 % down to 14.4 %.</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Key words   | <i>In vitro fertilization; elective single embryotransfer; blastocyst vitrification; cumulative pregnancy rate; multiple pregnancy rate</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

## Uvod

Evropska in ameriška poročila o rezultatih zdravljenja neplodnosti z metodami oploditve z biomedicinsko pomočjo (OBMP) v preteklih letih poročajo, da približno ena polovica tako spočetih otrok izhaja iz večplodnih nosečnosti.<sup>1,2</sup> Visok delež večplodnih nosečnosti po OBMP je bilo v preteklosti potrebno sprejeti zaradi ohranjanja še zadovoljive stopnje zanositve po OBMP, ki jo je bilo mogoče doseči s prenašanjem večjega števila manjceličnih zarodkov. Tudi s prenosom samo dveh blastocist se delež večplodnih nosečnosti ni zmanjšal.<sup>3</sup>

Kar nekaj raziskav je potrdilo, da prenos samo enega zarodka v maternico (angl. elective single embryotransfer ali eSET) v skupini bolnic z največjimi možnostmi za zanositev, lahko še vedno ohrani uspešnost, ki je primerljiva uspešnosti po prenosu dveh zarodkov (angl. double embryotransfer ali DET), delež dvojčkov pa se na ta način znatno zniža.<sup>4</sup> Analiza rezultatov OBMP v 906 ciklih iz 4 randomiziranih in v 7404 ciklih iz 6 kohortnih študij je potrdila uspešnost prenosa enega zarodka z deležem zanositev 33,9 %.<sup>5</sup> Po prenosu dveh zarodkov je zanosilo 35 % žensk, vendar je bilo kar 32,6 % zanositev večplodnih.

Pomisliki za prenos samo enega izbranega zarodka so bili v preteklosti upravičeni zaradi sorazmerno nizke stopnje uspešnosti programa zamrzovanja in odtajanja zarodkov. Ta je v evropskih državah znašala le okoli 15 % na en cikel odmrzovanja, kar je polovico nižja stopnja zanositve, kot jo dosežemo po prenosu svežih zarodkov.<sup>1</sup>

Razvoj novih tehnik zamrzovanja v zadnjih letih je izboljšal uspešnost zdravljenja neplodnosti s prenašanjem odmrznjenih zarodkov v maternico. Nova tehnika – vitrifikacija zarodkov – preprečuje nastanek kristalov ledu v mediju okoli ohlajevanega zarodka zaradi visokih koncentracij dodanega krioprotektanta. Metoda je sicer že stara, vendar jo je skupina japonskih raziskovalcev prilagodila zamrzovanju človeških zarodkov in jajčnih celic.<sup>6-9</sup>

V prispevku so prikazani prvi klinični rezultati uporabe vitrifikacije blastocist po postopku oploditve z IVF in vbrizgavanjem semenčice v citoplazmo jajčne celice (ICSI). Ker v Sloveniji od leta 2008 veljajo nova pravila o obveznem selektivnem prenosu enega samega kakovostnega zarodka v skupini mlajših žensk v prvih dveh poskusih zdravljenja z metodo OBMP, smo želeli ugotoviti, kako vpliva na uspešnost metod OBMP uporaba vitrifikacije zarodkov. Gre za izboljšano metodo zamrzovanja zarodkov, ki smo jo po testiranju na mišjih jajčnih celicah in zarodkih prvič v državi uspešno vpeljali v klinično prakso.

## Material in metode

### Zasnova raziskave in merila za prenos enega zarodka

V analizo so zajeti vsi zaporedni ciklusi IVF/ICSI, ki smo jih opravili v letu 2008, pri ženskah, mlajših od 36 let, ki so imele pred tem največ en IVF/ICSI postopek.

Potek vključevanja bolnic v raziskavo je prikazan v grafu 1. Vključenih je bilo 316 ciklusov. V 12 (3,8 %) ciklusih ni prišlo do oploditve jajčnih celic. Zaradi nevarnosti sindroma ovarijske hiperstimulacije (OHSS) se v 7 (2,3 %) ciklusih nismo odločili za prenos zarodkov. V 10 (3,3 %) ciklusih so se zarodki prenehali deliti, preden so dosegli stadij blastociste. Tretji dan po osemenitvi jajčnih celic je par na posvetu z ginekologom in embriologom soodločal o trajanju gojenja zarodkov in vitro (tri ali pet dni). Na dan prenosa zarodkov se je par ponovno dogovoril o številu prenesenih zarodkov. Zarodke smo prenašali tretji dan po aspiriranju v naslednjih primerih: če se je razvil le en sam zaro-

dek oziroma je bilo razvidno, da je samo en zarodek morfološko optimalen (> 6 enakomernih celic z manj kot 20 % citoplazmatskih fragmentacij in nefragmentiranimi jedri v posameznih blastomerah) oziroma če noben od zarodkov ni bil optimalne kakovosti.

Za podaljšano gojenje zarodkov do 5 dneva smo se odločali, če je bilo tretji dan več morfološko optimalnih zarodkov. Peti dan smo prenašali zarodke v stadiju blastociste ali kompaktne morule. Zarodkov v stadiju nekompaktnih morul nismo prenašali. Pri izboru blastocist smo upoštevali lastno klasifikacijo.<sup>10</sup> Za selektivni prenos ene blastociste smo se odločili, če je bila ocenjena vsaj z oceno 2, oziroma izjemoma tudi z oceno 3 (če so bile na razpolago samo zgodnje nefragmentirane blastociste z že nakazano notranjo celično maso).

Primarni cilj raziskave je bil ugotoviti kumulativno stopnjo zanositve po prenosu enega zarodka, upoštevajoč tudi zanositve po prenosu odmrznjenih blastocist. Sekundarni cilj raziskave je bil ugotoviti delež večplodnih nosečnosti.

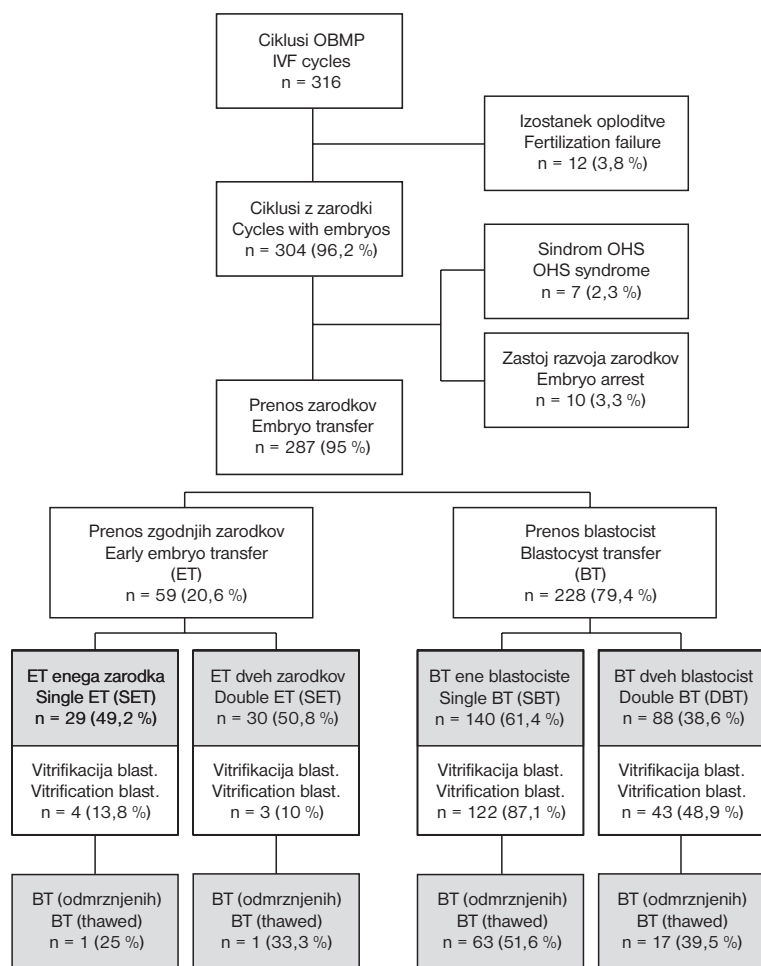
### Postopek OBMP

Po punkciji foliklov smo jajčne celice osemenili bodisi s klasično IVF bodisi z mehansko ICSI metodo. Za gojenje jajčnih celic in zarodkov smo uporabili gojišče BlastAssist System (Medicult, Jyllinge, Danska), prekrito s parafinskim oljem. Zarodke smo gojili v inkubatorjih z znižano koncentracijo kisika (5 % O<sub>2</sub>), ker smo v dosedanjih raziskavah dokazali boljši embrionalni razvoj v takšnih pogojih.<sup>11,12</sup> Zarodke smo pred prenosom v maternico gojili v gojišču, bogatem s hialuronanom (Embryoglu, Vitrolife, Gotteborg, Švedska). Prenos zarodkov smo naredili s katetrom Labotect (Labotect, Goettingen, Nemčija).

### Postopek vitrifikacije in devitrifikacije

Zarodke, ki jih tretji dan nismo prenesli v maternico, smo gojili do petega dneva. Če so dosegli stadij blastociste ali stadij kompaktne morule, smo jih pripravili za vitrifikacijo in potopitev v tekoči dušik. Za vitrifikacijo smo uporabljali komercialno gojišče Vitrication Cooling / Warming kit (Medicult, Jyllinge, Danska) in gojišče Vitrication Freeze / Thaw kit (Irvine Scientific, Santa Ana, ZDA). Zarodke, prepojene s krioprotektantom, smo položili na konico slamice za vitrifikacijo (VHS-CBS, L'Aigle, Francija), jo zavarili na obeh koncih in potopili v tekoči dušik. V vsako slamico smo shranili eno ali največ dve blastocisti.

Za odmrzovanje smo uporabili ustrezne raztopine za devitrifikacijo od prej naštetih proizvajalcev. Po odmrzovanju



Sl. 1. Sledenje poteka zdravljenja neplodnosti z metodo IVF/ICSI pri 316 parih (ciklusih), ki bi po pravilih Zavoda za zdravstveno zavarovanje Slovenije (ZZZS) bili kandidati za prenos samo enega zarodka. Ženske so bile mlajše od 36 let in so imele največ en postopek IVF v anamnezi. Za prenos dveh zarodkov smo se odločili le, ko zarodki po morfoloških merilih niso bili optimalni. (OBMP – oploditev z biomedicinsko pomočjo; OHS – ovarijska hiperstimulacija).

Figure 1. Flow chart of infertility treatment by IVF/ICSI method in 316 couples (cycles), which should be the candidates for only one transferred embryo according to the Health Insurance Institute of Slovenia directives. The women were younger than 36 and had no more than one IVF attempt in anamnesis. Two embryos were transferred only in cycles in which the embryos were not optimal regarding morphology criteria. (IVF – in vitro fertilization; OHS – ovarian hyperstimulation).

Tab. 1. *Klinični rezultati po prenosu svežih zarodkov in devitrificiranih zarodkov ter kumulativna stopnja zanositve v skupini ženske (mlajše od 36 let, 1. ali 2. IVF postopek), ki imajo lahko po pravilu Zavoda za zdravstveno zavarovanje Slovenije prenos samo enega zarodka optimalne kakovosti oziroma izjemoma več zarodkov, če so ti neoptimalni.*

Table 1. *Clinical outcomes of fresh transfers, devitrification transfers and cumulative pregnancy rate in group of women (younger than 36, 1<sup>st</sup> or 2<sup>nd</sup> IVF cycle), which – according to directives of the Health Insurance Institute of Slovenia – had to have transferred only one top-quality embryo or exceptionally more embryos, if they are not optimal.*

|                                                                                             | Prenos zarodkov<br>Embryo transfer |              | Prenos blastocist<br>Blastocyst transfer |              | Skupaj<br>Total |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------|------------------------------------------|--------------|-----------------|
|                                                                                             | SET*                               | DET**        | SBT                                      | DBT          |                 |
| Sveži ciklusi<br>Fresh cycles                                                               |                                    |              |                                          |              |                 |
| Ciklusi s prenosom svežih zarodkov<br>Cycles with transfer of fresh embryos                 | 29                                 | 30           | 140                                      | 88           | 287             |
| Klinične nosečnosti (%)<br>Clinical pregnancies (%)                                         | 5<br>(17,2)                        | 15<br>(50)   | 77<br>(55)                               | 38<br>(43,2) | 135<br>(47)     |
| Potrjene klinične nosečnosti (%)<br>Ongoing pregnancies (%)                                 | 5<br>(17,2)                        | 14<br>(46,7) | 72<br>(51,4)                             | 36<br>(40,9) | 127<br>(44,3)   |
| Enoplodne nosečnosti (%)<br>Singletons (%)                                                  | 5                                  | 12           | 72                                       | 18           | 107<br>(84,3)   |
| Dvoplodne nosečnosti (%)<br>Twins (%)                                                       | 0<br>(0)                           | 2<br>(14,3)  | 0<br>(0)                                 | 18<br>(50)   | 20<br>(15,7)    |
| Ciklusi z vitifikacijo preostalih blastocist<br>Cycles with vitrified surplus blastocysts   | 4                                  | 3            | 122                                      | 43           | 172<br>(59,9)   |
| Devitrifikacija v naslednjih ciklih<br>Devitrification in following cycles                  |                                    |              |                                          |              |                 |
| Ciklusi z devitrifikacijo blastocist<br>Blastocyst devitrification cycles*                  | 1                                  | 1            | 63                                       | 17           | 82<br>(47,7)    |
| Nosečnosti (%)<br>Pregnancies (%)                                                           | 1                                  | 0            | 23                                       | 2            | 26<br>(31,7)    |
| Spontana prekinitve nosečnosti (%)<br>Miscarriages (%)                                      | 0                                  | 0            | 7                                        | 0            | 7<br>(26,9)     |
| Potrjene klinične nosečnosti (%)<br>Ongoing pregnancies (%)                                 | 1                                  | 0            | 16<br>(25,4)                             | 2<br>(11,8)  | 19<br>(23,2)    |
| Enoplodne nosečnosti (%)<br>Singletons (%)                                                  | 0                                  | 0            | 16                                       | 2            | 18<br>(94,7)    |
| Dvoplodne nosečnosti (%)<br>Twins (%)                                                       | 1                                  | 0            | 0                                        | 0            | 1<br>(5,3)      |
| Kumulativni rezultati<br>Cumulative outcomes                                                |                                    |              |                                          |              |                 |
| Potrjene klinične nosečnosti kumulativno (%)<br>Cumulative ongoing clinical pregnancies (%) | 6<br>(20,7)                        | 14<br>(46,7) | 88<br>(62,9)                             | 38<br>(43,2) | 146<br>(50,9)   |
| Enoplodne nosečnosti kumulativno (%)<br>Cumulative singletons (%)                           | 5                                  | 12           | 88                                       | 20           | 125<br>(85,6)   |
| Dvoplodne nosečnosti kumulativno (%)<br>Cumulative twins (%)                                | 1                                  | 2            | 0                                        | 18           | 21<br>(14,4)    |
| Neporabljene vitrificirane blastociste<br>Unused vitrified blastocysts                      | 4                                  | 2            | 418                                      | 100          | 524             |

SET – Prenos enega zarodka / Single embryo transfer

DET – Prenos dveh zarodkov / Double embryo transfer

SBT – Prenos ene blastociste / Single blastocyst transfer

DBT – Prenos dveh blastocist / Double blastocyst transfer

\* – V 25 ciklih prenos edinega zarodka in v 4 ciklih enega izbranega zarodka / In 25 cycles: transfer of the only single embryo. In 4 cycles: elective single embryo transfer

\*\* – V 15 ciklih prenos dveh slabih zarodkov in v 15 ciklih dveh dobrih ali enega dobrega, enega slabega zarodka (v obdobju pred prejetimi dodatnimi pojasnili ZZZS) / In 15 cycles: transfer of two poor embryos. In 15 cycles: transfer of 2 good or 1 good, 1 poor embryo (in the period before the Health Insurance Institute of Slovenia sent the additional instructions)

smo blastociste gojili še dve uri in opazovali, ali se je med postopkom izpraznjeni blastocel uspel ponovno razširiti. Blastocisto smo ocenili kot preživelo, ko je vsebovala več kot 50 % nepoškodovanih celic.

Še preden se je uspel blastocel napolniti s tekočino, smo pri vseh blastocistah z laserskim žarkom (Saturn Active, RI, Cornwall, Velika Britanija) stanjšali cono pelucido, da bi odpravili morebiten negativni učinek zatrditve cone med postopkom vitifikacije.

### Priprava bolnic za prenos odmrznjenih blastocist

Bolnice z rednimi menstruacijskimi cikli smo pripravili za prenos blastociste v naravnem ciklusu. Rast folikla smo spremljali z ultrazvokom. Z urinskimi testi za določanje vrha luteinizirajočega hormona (LH) smo določili dan prenosa zarodkov.

Endometrij žensk z nerednimi menstruacijami smo pripravili za prenos zarodkov z dnevnim odmerkom

4–6 mg estradiol valerata (Estrofem, NovoNordisk, Copenhagen, Danska ali Progynova, Schering AG, Berlin, Nemčija) od prvega dne menstruacijskega ciklusa. Od 12. dne ciklusa so prejemale tudi dnevni odmerek 600 mg progesterona (Utrogestan, Asta Medica, Dunaj, Avstrija) ali 30 mg didrogesterona (Dabroston, Belupo, Koprivnica, Hrvaška). Po pregledu z ultrazvokom smo določili dan prenosa zarodkov (najpogosteje med 17. do 19. dnevom).

## Rezultati

Rezultati prenosov zarodkov so prikazani v Tabeli 1. V preiskovani skupini bolnic smo se v 59 (20,6 %) primerih odločili za prenos zgodnjih, tri dni starih zarodkov. Med njimi smo 29 (49,2 %) ženskam prenesli en zarodek, ki je bil v 25 primerih tudi edini zarodek, medtem ko smo v 4 primerih naredili prenos enega izbranega zarodka, preostale pa smo gojili do blastociste in jih v vseh 4 primerih tudi shranili v tekočem dušiku. V 30 ciklikih smo prenesli po dva zgodnja zarodka. Razlog za prenos dveh zarodkov je bil v 18 ciklikih slaba morfolologija zarodkov. Pri preostalih 12 ciklikih smo na željo bolnic prenesli dva kakovostna zarodka, ker v začetku leta 2008 še niso veljali pogoji zavarovalnice o prenosu enega zarodka. V treh od teh 12 ciklov smo nadštevile zarodke v stadiju blastociste tudi zamrzili.

Po podaljšanem gojenju zarodkov smo v 228 (79,4 %) ciklikih prenesli v maternico blastociste. V 140 (61, %) primerih smo za prenos izbrali eno samo blastocisto in v kar 87,1 % (122/140) teh ciklov smo preostale blastociste shranili z vitrifikacijo.

V maternico smo prenesli po dve blastocisti 88. ženskam (38,6 %). V slednji skupini smo se za prenos dveh blastocist odločili zaradi neoptimalne morfolologije zarodkov. Kljub slabši morfološki oceni blastocist smo v 43 (48,9 %) ciklikih neoptimalne blastociste tudi vitrificirali.

V ciklikih, v katerih smo prenesli po en zgodnji zarodek, je zanosilo le 17,2 % (5/29) žensk. Po prenosu dveh zgodnjih zarodkov smo beležili klinično potrjeno nosečnost v 46,7 % (14/30), od tega v 14,3 % dvoplodno nosečnost.

Po prenosu ene blastociste je zanosilo 51,4 % (72/149) žensk. Po prenosu dveh morfološko neoptimalnih blastocist je bila ugotovljena klinična nosečnost pri 40,9 % (36/88) žensk, od tega je bilo 50 % (18/36) nosečnosti večplodnih.

Zaradi neuspešnega prvega postopka IVF s prenosom svežih zarodkov so se ženske v 82 primerih odločile za prenos preostalih vitrificiranih blastocist. Postopek vitrifikacije je bil najbolj uspešen v skupini žensk, v katerih smo v svežem ciklusu prenesli le eno izbrano blastocisto (25,4 % kliničnih nosečnosti). V tistih ciklikih, v katerih smo se odločali za prenos dveh suboptimalnih blastocist, so zaradi slabše morfolologije blastocist pred zamrzovanjem bili slabši tudi rezultati vitrifikacije (11,8 % kliničnih nosečnosti).

Kumulativna stopnja zanositve v skupini žensk, v kateri smo prenesli eno svežo blastocisto in v naslednjih ciklikih še devitificirane blastociste, je znašala 62,9 %. V celotni skupini žensk, ki so bile kandidatke

za prenos enega zarodka po pravilih zdravstvene zavarovalnice, je zanosilo 50,9 % bolnic, med njimi je bilo 14,4 % dvoplodnih nosečnosti.

## Razpravljanje

Uspešnost prenosa enega samega zarodka je povezana z uspešnostjo selekcije zarodkov. Glavno vprašanje pri tem je, ali znamo dovolj zanesljivo prepoznati zarodek z najvišjo sposobnostjo vgnezditev v maternico.

V nekaterih državah, kjer so sprejeli standard o prenosu enega zarodka v mlajši skupini bolnic, nimajo možnosti spreminjanja števila zarodkov zaradi slabše kakovosti zarodkov. Definicija pogojev za eSET, ki pogojuje prenos enega zarodka optimalnega kakovosti, dopušča centrom precej svobode pri določanju meril za eSET ali DET. Obvezen prenos enega zarodka, ne glede na njegovo morfolologijo, bistveno zniža uspešnost postopkov OBMP v primerjavi z uspešnostjo, ki jo dosegajo centri z nekoliko bolj prilagodljivim načinom selekcije za embriotransfer, ko se upošteva tudi kakovost zarodkov.<sup>13</sup>

V našem centru smo ženskam, ki bi sicer bile primerne za prenos enega zarodka, kar v 41 % primerov prenesli po dva zarodka, izključno zaradi tega, ker so bili zarodki slabše morfolologije. Prenos dveh zarodkov v zgodnji fazi razvoja na tretji dan ni znatno povečal deleža dvoplodnih nosečnosti. Drugače je bilo v skupini bolnic, pri kateri smo prenesli dve neoptimalni blastocisti. Zabeležili smo 40 % zanositev, vendar je bilo kar 50 % zanositev dvoplodnih.

V prihodnje je potrebno upoštevati, da je vgnezditevna sposobnost suboptimalnih blastocist sicer nižja od sposobnosti optimalnih, vendar še vedno znaša od 20 do 30 %.<sup>10</sup> Zato je pri blastocistah morda smiselno razširiti pojmovanje optimalnega zarodka (optimalnega v luči meril Zavoda za zdravstveno zavarovanje (ZZZS)) tudi na nekatere kategorije sicer morfološko suboptimalnih blastocist. To so blastociste z normalno notranjo celično maso (ICM) in delno fragmentiranim trofektodermom in pa zgodnje blastociste, pri katerih se ICM še ni oblikovala. Pri slednjih bi bilo morda smiselno prenos zarodkov preložiti za nekaj ur, ko se ICM morda lahko oceni bolj natančno.

Izbiranje zarodkov na podlagi morfoloških dejavnikov se najpogosteje uporablja, vendar dokaj nenatančno. Zato se iščejo dodatni, bolj natančni napovedni kazalci uspešnega embrionalnega razvoja. Večina doslej razvitih metod, kot so genetski pregled posamezne blastomere (angl. preimplantation genetic screening – PGS), ugotavljanje vitalnosti zarodkov s spremljanjem porabe kisika, metabolomike ali proteomike zaradi nivoja tehnične zahtevnosti ali nevarnosti za zarodek, niso v širši uporabi. Podaljšano gojenje zarodkov do stadija blastocist, do katerega se zaradi pomembne kontrolne točke razvoja na osemceličnem stadiju uspe razviti samo dobra polovica zarodkov, je še vedno najbolj naraven sistem izbire. Takšna selekcija se ne razlikuje od samoselekcije in vivo, če so laboratorijski pogoji zadosti kakovostni.<sup>14</sup>

Se pa vse bolj uveljavljajo metode bolj natančnega sledenja razvoja in ocenjevanja dodatnih morfoloških kazalcev posameznega zarodka. S takšnim sledenjem

v skandinavskih državah, kjer so svoj čas močno podpirali blastocistno gojenje, ponovno pogosteje prehajajo na prenos zarodkov na tretji ali celo drugi dan.<sup>15</sup> Eden od argumentov za takšen pristop je tudi spoznanje, da blastociste niso najprimernejši stadij za zamrzovanje, čeprav so z uporabo vitifikacije rezultati boljši.<sup>16</sup> Iz letnih poročil slovenskih centrov v EIM je mogoče dobiti podatek o uspešnosti prenosa odmrznjenih blastocist, ki so bile zamrznjene s staro metodo počasnega zamrzovanja.<sup>17</sup> Le-ta je okoli 15–19 %. Z novo metodo vitifikacije, ki je enostavnejša, je z odmrznjenimi zarodki zanosilo 23 % bolnic. V skupini tistih ciklusov, v katerih smo se v svežem ciklusu odločili za prenos le ene blastociste, je zanosilo celo 25,4 % bolnic. Še pomembneje je, da smo v tej skupini žensk z dodatnim prenosom blastocist po devitifikaciji dvignili stopnjo zanositve iz že tako visokih 51,4 % na 62,9 % kumulativno. Enako uspešnost (62,4 % zanositev in 13,4 % dvojčkov) so dosegli z omejevalno politiko števila prenesenih zarodkov tudi na Nizozemskem.<sup>13</sup> Izbrana omejevalna politika za zmanjševanje deleža večplodnih nosečnosti v postopih OBMP kaže pozitivne učinke. Kljub zmanjšanju števila prenesenih zarodkov se je ohranila visoka uspešnost postopka OBMP, čeprav se večplodnim nosečnostim na ta način ni bilo mogoče popolnoma izogniti. Če bi enaka merila za SET prenesli na neselekcionirano skupino žensk, bi povzročili znatno poslabšanje rezultatov zdravljenja.<sup>18</sup>

## Zaključki

V skupini bolnic, ki bi po definiciji zadostile pogojem za eSET, smo z novim pristopom dosegli visoko stopnjo zanositve v enem svežem ciklusu (44,3 %) in visoko kumulativno stopnjo zanositve z dodatnim prenosom odmrznjenih zarodkov (50,9 %). Z omejevalno politiko prenašanja več zarodkov in spodbujanjem selektivnega prenosa enega zarodka se je delež večplodnih nosečnosti znižal iz nekdanjih 40 % na 14,4 %. Pričakujemo, da bo kumulativna stopnja zanositve še višja, saj je veliko število zarodkov ostalo še zamrznjenih. Dodatno zmanjšanje deleža dvojčkov bi lahko dosegli s še natančnejšim ocenjevanjem morfoloških in drugih dejavnikov razvoja zarodkov. Zaželeno in sprejemljivo stopnjo dvoplovnih nosečnosti v programu OBMP je 5 %.

## Literatura

- Nyboe Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S, Ferraretti AP, Kupka MS, de Mouzon J, et al. Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod* 2009; 24: 1267–87.
- Schieve LA, Peterson HB, Meikle SF, Jeng G, Danel I, Burnett NM, et al. Live-birth rates and multiple-birth risk using in vitro fertilization. *JAMA* 1999; 282: 1832–8.
- Vlaisavljevic V, Dmitrovic R, Sajko MC. Should the practice of double blastocyst transfer be abandoned? A retrospective analysis. *Reprod Biomed Online* 2008; 16: 677–83.
- <http://www.eshre.com/ESHRE/English/Legal-Matters-and-Guidelines/Guidelines/Good-clinical-treatment-position-paper/page.aspx/225> (6. 7. 2009).
- Gerris JM. Single embryo transfer and IVF/ICSI outcome: a balanced appraisal. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 105–21.
- Mukaída T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M, Takahashi K. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil Steril* 2001; 76: 618–20.
- Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod* 2004; 19: 2884–8.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 608–14.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 300–8.
- Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 687–94.
- Kovačič B, Vlaisavljevič V. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008; 17: 229–36.
- Kovačič B, Sajko MC, Vlaisavljevič V. A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. V tisku 2009.
- Van Montfoort AP, Fiddlers AA, Land JA, Dirksen CD, Severens JL, Geraedts JP, et al. eSET irrespective of the availability of a good-quality embryo in the first cycle only is not effective in reducing overall twin pregnancy rates. *Hum Reprod* 2007; 22: 1669–74.
- Kovačič B, Vlaisavljevič V, Reljic M, Gavrić Lovrec V. Clinical outcome of day 2 versus day 5 transfer in cycles with one or two developed embryos. *Fertil Steril* 2002; 77: 529–36.
- Karlstrom PO, Bergh C. Reducing the number of embryos transferred in Sweden—impact on delivery and multiple birth rates. *Hum Reprod* 2007; 22: 2202–7.
- Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008; 90: 186–93.
- Virant-Klun I, Tomazevic T, Zorn B, Bacer-Kermavner L, Mivsek J, Valentincic-Gruden B, et al. Successful freezing and thawing of blastocysts cultured in sequential media using a modified method. *Fertil Steril* 2003; 79: 1428–33.
- Van Montfoort AP, Fiddlers AA, Janssen JM, Derhaag JG, Dirksen CD, Dunselman GA, et al. In unselected patients, elective single embryo transfer prevents all multiples, but results in significantly lower pregnancy rates compared with double embryo transfer: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2006; 21: 338–43.