

Sara Korošec¹, Petra Kaplan²

Pogostost kromosomskih nepravilnosti pri otrocih, rojenih z biomedicinsko pomočjo³

Rates of Chromosomal Anomalies in Children Conceived after Assisted Reproductive Techniques

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: oploditev *in vitro*, embrio transfer, intracitoplazmatsko vbizganje spermijev, kromosomske nepravilnosti

Izhodišče. Kljub dvomom o varnosti postopka oploditve v epruveti s prenosom zarodka (IVF-ET), postopka oploditve z vbizganjem spermija v citoplazmo (ICSI) in uporabi zamrznjenih zarodkov raziskave kažejo, da tveganje za prirojene nepravilnosti ni bistveno povečano. Izkazalo se je le, da so pri novorojenčkih, rojenih po oploditvi s postopkom ICSI, pogostejše nepravilnosti spolnih kromosomov. Dejavniki tveganja neplodnih parov so njihova višja starost, neplodnost in pogostejše mnogoplodne nosečnosti. Ocena pojavnosti kromosomskih, pa tudi strukturnih prirojenih nepravilnosti pri nas bi bila uporabna pri obravnavi neplodnih parov v prihodnosti.

Namen in hipoteze raziskave. V naši raziskavi želimo ugotoviti, ali so prirojene nepravilnosti pri novorojenčkih, rojenih po postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo, pogostejše kot pri novorojenčkih, rojenih po spontani zanositvi.

Preiskovanke in metode dela. V retrospektivno raziskavo smo vključili 242.164 novorojenčkov, ki so se rodili 241.607 materam od aprila 1987 do decembra 1997 v Sloveniji, ter jo razdelili na 3 kohortne in 1 kontrolirano študijo. V prvih dveh študijah smo primerjali pojavnost kromosomskih, strukturnih in letalnih prirojenih nepravilnosti. Pri prvi študiji smo primerjali 1404 novorojenčkov, rojenih po oploditvi s postopkom IVF-ET, z novorojenčki, rojenimi po spontani zanositvi. Pri drugi, kontrolirani študiji, smo primerjali 1270 novorojenčkov rojenih po oploditvi mater s postopkom IVF-ET, s 1270 novorojenčki, rojenimi materam po spontani zanositvi ob tem, da smo matere po starosti, številu plodov, pariteti in letu poroda izenačili. Pri tretji študiji smo ugotavljali pojavnost kromosomskih, strukturnih in letalnih prirojenih nepravilnosti glede na način oploditve. 73 novorojenčkov s prirojenimi nepravilnostmi, rojenih po oploditvi s postopkom IVF-ET, smo primerjali s 9685 novorojenčki s prirojenimi nepravilnostmi, rojenimi po spontani zanositvi. V četrti študiji smo ugotavljali možne dejavnike tveganja (starost, mnogoplodnost, pariteta in izvedba postopka ICSI) pri materah, udeleženi v postopku IVF-ET. Primerjali smo 54 mater novorojenčkov, rojenih po oploditvi s postopkom IVF-ET, ki imajo prirojene nepravilnosti, s 1048 materami novorojenčkov, rojenih po oploditvi s postopkom IVF-ET, ki nimajo prirojenih nepravilnosti. Rezultate smo ovrednotili s testom hi-kvadrat za neparametrične in t-testom za parametrične spremenljivke. Razlike med vzorci smo imeli za statistično značilne, kadar je bila stopnja tveganja (vrednost p) manjša od 0,05 ($p < 0,05$).

¹ Sara Korošec, štud. med., Klinični oddelek za reprodukcijo, SPS Ginekološka klinika Ljubljana, Šlajmerjeva 2, 1000 Ljubljana.

² Petra Kaplan, štud. med., Klinični oddelek za reprodukcijo, SPS Ginekološka klinika Ljubljana, Šlajmerjeva 2, 1000 Ljubljana.

³ Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1999.

Rezultati. Pri novorojenčkih, rojenih po postopku oploditve z biomedicinsko pomočjo, smo ugotovili več vseh prirojenih nepravilnosti skupaj, več letalnih nepravilnosti, več malformacij dihal, srca in obtočil ter manj malformacij mišično-skeletnega sistema kot pri novorojenčkih, rojenih po spontani zanositvi. Po izenačitvi mater po starosti, pariteti, mnogoplodnosti in letu poroda nismo pri primerjavi novorojenčkov našli nobenih značilnih razlik. Pri novorojenčkih s prirojenimi nepravilnostmi, rojenih po postopku oploditve z biomedicinsko pomočjo, smo našli večji delež letalnih nepravilnosti, malformacij srca in obtočil ter manjši delež malformacij mišično-skeletnega sistema kot pri novorojenčkih s prirojenimi nepravilnostmi, rojenih po spontani zanositvi. Pri materah, zdravljenih s postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo, ki so rodile otroke s prirojenimi nepravilnostmi, nismo ugotovili nič več dejavnikov tveganja kot pri materah, zdravljenih s postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo, ki so rodile neprizadete otroke. Pri novorojenčkih, rojenih po postopku oploditve ICSI, smo našli štiri manjše nepravilnosti.

Zaključki. Ugotovili smo, da postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo ne povečujejo verjetnosti nastanka prirojenih nepravilnosti. Malformacije srca in obtočil predstavljajo večji delež prirojenih nepravilnosti po oploditvi z biomedicinsko pomočjo kot po naravni oploditvi. Postopek ICSI ni dejavnik tveganja za nastanek kromosomskih nepravilnosti pri materah, zdravljenih z metodami oploditve z biomedicinsko pomočjo.

ABSTRACT

KEY WORDS: fertilization *in vitro*, embryo transfer, sperm injections intracytoplasmic, chromosomal abnormalities

Background. Despite doubts about safety of *in vitro* fertilisation-embryo transfer (IVF-ET), intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and use of frozen embryos, statistical analyses up to date have shown that risk of congenital malformations is not essentially different from the risk in case of natural conception. The only fact that was shown is that in neonates born after ICSI procedure, abnormalities of sex chromosomes were present more often. Risk factors of sterile couples are: their age, sterility and frequent multiple pregnancies. An assessment of prevalence and distribution of chromosomal and structural malformations in our country would be useful in treating the sterile couples in the future.

Aim and hypothesis. The aim of the survey is to determine whether rates of congenital malformations in neonates born after assisted reproductive techniques are higher than in neonates born after a spontaneous conception.

Patients and methods. 242,164 neonates born to 241,607 mothers from April 1987 to December 1997 in Slovenia, were included in retrospective survey. The survey was divided into 3 cohort and 1 case-controlled studies. In first two studies prevalence of chromosomal, structural and lethal abnormalities were observed. In first study we compared 1404 neonates born after IVF-ET procedure with neonates born after spontaneous conception. In second controlled study we compared 1270 neonates born after IVF-ET procedure with 1270 neonates born after spontaneous conception, whose mothers were matched according to their age, multiplicity, parity and year of birth. In third study we observing the shares of congenital abnormality rates according to a form of fertilisation. We compared 73 neonates with congenital abnormalities, born after IVF-ET procedure with 9685 neonates with congenital abnormalities, born after spontaneous conception. In the fourth study we were assessing possible risk factors (age, multiplicity, parity and ICSI procedure). We compared 54 mothers of neonates with congenital malformations with 1048 mothers of neonates without congenital malformations born after IVF-ET procedure. Data of neonate born after frozen embryo transfer was analysed in descriptive manner. Results were statistically evaluated by chi-square test for non-parametrical variables and t-test for parametrical variables.

Results. More lethal, respiratory, cardiovascular malformations and less locomotor system malformations were found in neonates conceived after assisted reproductive techniques

than in neonates of general population. No differences between the two groups of neonates were found after matching their mothers according to age, multiplicity, parity and year of birth. In the group of neonates with congenital abnormalities we found bigger share of lethal and cardiovascular malformations and smaller share of locomotor malformation in the group of neonates conceived after assisted reproductive techniques than in the group of neonates born after spontaneous conception. In comparison of mothers treated with assisted reproductive techniques whose neonates were born with congenital abnormalities and those treated mothers whose neonates had any congenital abnormalities we found no significant risk factors. In neonates born after ICSI we found only four minor abnormalities.

Conclusions. We established that assisted reproductive techniques do not raise congenital abnormality rates. We established higher share of cardiovascular abnormalities among all congenital abnormalities after assisted conception. ICSI procedure is not a risk factor for birth of abnormal neonate to mothers treated with assisted reproductive techniques.

UVOD

Eno izmed vprašanj o varnosti metod umetne oploditve je tudi vprašanje o pogostnosti prirojenih nepravilnosti. Številne študije dokazujejo, da sta postopek oploditve v epruveti s prenosom zarodka (IVF-ET) (1-12) in postopek oploditve z vbizgavanjem spermija v citoplazmo (ICSI) (1, 9, 12-14) varna in nista v vzročni zvezi z večjo pojavnostjo prirojenih nepravilnosti. Pogostejši splavi po umetni oploditvi zagotavljajo naraven izbor bolj kakovostnih zarodkov. Spremljanje razvoja otrok in morfološke preiskave niso pokazale nič več težav, kot jih je v splošni populaciji otrok (6, 10, 15-17). Tudi spremljanje otrokovega kasnejšega razvoja ni pokazalo negativnih odstopanj (16, 18-21). Izkazalo pa se je, da so pri otrocih, rojenih po postopku oploditve ICSI, pogostejše nepravilnosti spolnih kromosomov (2, 22). Ocena pojavnosti in porazdelitve prirojenih nepravilnosti pri nas bi bila uporabna pri diagnostični obravnavi in zdravljenju neplodnosti. V nalogi se bomo poleg kromosomskih omejili tudi na strukturne nepravilnosti.

Metode oploditve z biomedicinsko pomočjo

Z neplodnostjo ima težave 8-10% parov. Delež neplodnosti v današnjem času narašča na račun naraščanja pogostosti vnetja rodil in spolno prenosljivih bolezni, odlašanja z rojstvom prvega otroka in boljših diagnostičnih postopkov ter zdravljenj, ki omogočajo, da danes odkrijemo več primerov neplodnosti kot nekdanj (23-25).

Metode oploditve z biomedicinsko pomočjo so tehnike, pri katerih s klinično ali biološko obdelavo spermijev, jajčnih celic ali obojih poizkušamo doseči nosečnost (26).

Postopek oploditve v epruveti s prenosom zarodka (IVF-ET)

Oploditev v epruveti s prenosom zarodkov (IVF-ET) je poseg, pri katerem jajčece ženske oplodimo v gojišču s semenčico moškega (in vitro fertilisation) in zarodke prenesemo v maternico (embriotransfer).

Najpogostejša indikacija za izvedbo oploditve po postopku IVF-ET so nepopravljivo okvarjeni ali operativno odstranjeni jajcevođi (80-90%). Sledijo ji vzroki pri moškem (oligozoospermija, astenozoospermija in azoospermija), idiopatska neplodnost, endometriozna, imunološki vzroki (protispermijška protitelesa), bolezen policističnih jajčnikov in drugi (27-29).

S sprožitvijo ovulacije začne zoreti večje število foliklov, kar zveča možnost oploditve (25, 26, 30). Za spodbujanje uporabljamo kломifen citrat (Clomid), človeške menopavzne gonadotropine (HMG), človeške horionske gonadotropine (hCG), gonadotropine sproščujoči hormon (GnRH), njegove agoniste in antagonist (GnRH, GnRH-a) in rastni hormon (25, 27, 30). Naštete snovi uporabljamo v skladu z različnimi protokoli. Primerjave uspešnosti različnih protokolov so težke, ker se le-ti zelo razlikujejo med seboj (25, 26). Oploditev v postopku je mogoča tudi brez spodbujanja z uporabo jajčne celice iz naravnega cikla (26).

Pred vsrkavanjem jajčnih celic določimo serumsko raven estradiola, ultrazvočno ocenimo število in velikost jajčnih foliklov ter morfološke spremembe endometrija. Vsrkavanje jajčnih celic skozi nožnico, ki je na Ginekološki kliniki v Ljubljani metoda izbire, se izvaja preko stranskega žepna nožnice s pomočjo posebne UZ-naprave, prilagojene za nožnične punkcije. Punkcija je uspešna tudi pri obsežnih zarastlinah, omogoča razmeroma dober dostop do jajčnikov, poteka pa lahko v lokalni anesteziji (25, 27).

Vsrkane jajčne celice ocenimo pod mikroskopom, speremo in inkubiramo. Sveže ali zamrznjeno seme najprej utekočinimo, ocenimo, očistimo in inkubiramo. Jajčne celice oplodimo z velikim številom spermijev na posebnih gojiščih. Naslednji dan ocenimo oplojenost. Neoplojene in nepravilno oplojene jajčne celice izločimo. Drugi dan imamo že zarodek z 2–6 blastomerami (26).

Zarodke vnesemo v maternično votlino s katetrom, ki vsebuje tudi gojišče. Od leta 1991 se prenašajo največ po 3 zarodki iz 2-dnevne kulture ali po 2 moruli ali blastocisti iz 4-dnevne, zadnje čase pa celo 5-dnevne kulture. Prenos opravimo v ginekološkem položaju, bolnica še isti dan zapusti bolnišnico. Neuporabljene zarodke zamrznemo, da jih lahko uporabimo v naslednjih ciklusih (26, 31, 32).

Uspeh oploditve je odvisen od zarodkovih, materinih in očetovih dejavnikov. Zarodkove dejavnike predstavljajo kakovost in število zarodkov. Na kakovost zarodka vpliva kakovost gamet, pravi čas osemenitve in oploditve ter prava sestava gojišča (25). Večje število prenesenih zarodkov poveča število uspešnih postopkov, hkrati pa poveča število večplodnih nosečnosti (25, 33–38). Da bi to preprečili, se odločamo za prenos manjšega števila bolj kakovostnih zarodkov (34) na višji razvojni stopnji (31, 39–41).

Materini dejavniki so starost ženske, delovanje roditelj, število dozorelih foliklov, kakovost lutealne faze in sprejemljivost maternične sluznice (42, 43). Plodnost ženske se z leti zmanjšuje zaradi degeneriranja spolnih celic, večjega števila genetsko nepravilnih zarodkov in upadanja sprejemljivosti maternične sluznice (25, 27, 42). Možnost vgnezenja se po 40. letu zniža za več kot 50%, poveča pa se tudi število spontanih splavov (25, 27, 44–46). Študije kažejo, da sodi tudi stres med pomemb-

ne negativne dejavnike (42, 43). Najbolj tipična mati pri postopku je nekaj let starejša, pogosto poročena, bolj izobrazjena, ki kadi manj kot druge in ima za seboj manj nosečnosti in porodov (47, 48). Od moških dejavnikov sta pomembna dejavnika kakovost (gibljivost, oblika) in število semenčic.

Po zanositvi lahko nastopi spontani splav (20–30%), porod (65–80%) ali izvenmaternična nosečnost (3–5%). Enoplodnih nosečnosti je 60–80%, večplodnih nosečnosti pa 15–25% (3, 33, 49).

Zapleti pri postopku so različni. Ovarijski hiperstimulacijski sindrom (OHS) se pojavlja pri 3–4% spodbujanj. Klinično se lahko kaže z zelo blagimi znaki, ki minejo z menstruacijo, pa vse do težkih, z jajčniki, večjimi od 12 × 12 cm, s cistami, ovarijsko torzijo, ascitesom, hidrotoraksom, dihalno stisko, hemokoncentracijo in motnjami strjevanja krvi, delovanja jeter in ledvic. V takih primerih je nujno bolnišnično zdravljenje (3, 42, 50). Ob grožecem resnem OHS pri nas opravijo zgodnjo aspiracijo foliklov (terapevtska aspiracija). Način izvedbe je enak kot pri zbiranju jajčec, le da jo opravimo 10–12 ur po uporabi HCG in le na enem jajčniku. Tako na Ginekološki kliniki v Ljubljani od leta 1992–93 niso več zasledili hujših oblik OHS (51). Zelo redki zapleti so poškodbe, krvavitve in okužbe (3). Najpogostejši in s tem najpomembnejši zaplet uspelega postopka IVF-ET je večplodna nosečnost (3, 25, 41–43, 49, 52, 53), ki je v vzročni povezavi s številom prenesenih zarodkov in starostjo matere (34–38, 54).

Mikromanipulacija in postopek oploditve z vbrizgavanjem spermija v citoplazmo (ICSI)

Mikromanipulacija je kirurški postopek, pri katerem se uporabljajo mikroorodja. Mikroorodja so narejena iz tankih steklenih kapilar, skozi katere se lahko ob delu pretaka tekočina. Opremo za mikromanipulacijo sestavlja tudi svetlobni mikroskop z 200- do 400-kratno povečavo, na katerega so pritrjeni manipulatorji za natančne gibe. Mikromanipulacija se uporablja za oploditev jajčnih celic, pospeševanje vgnezenja zarodkov, odstranjevanje materiala iz jajčnih celic ali zarodkov za genetsko analizo ter za prenašanje citoplazme in jeder (55).

Postopek ICSI je na Ginekološki kliniki v Ljubljani v uporabi od leta 1994. Pri postopku vbrizgamo spermij s pomočjo mikroorodja neposredno v jajčno celico. Spermije lahko dobimo iz svežega ali zamrznjenega ejakulata, aspirata epididimisa, testisa ali bioptičnega vzorca testisa (55, 56).

Indikacije za postopek ICSI so: oligozoospermija, teratozoospermija, astenozoospermija, nekrozoospermija, protispermijška protitelesa, ponavljajoča se neuspela oploditev v postopku IVF, motnje ejakulacije, obojestranska aplazija vas deferens, fibroza epididimisa, neuspeli vazostomija in vazoepididimostomija in zapora obeh ejakulacijskih vodov (1, 57).

V postopku ICSI je za oploditev dovolj en sam spermij. Pri tem ni potrebno, da so spermiji gibljivi, čeprav je stopnja zanositve pri negibnih spermijih nekoliko nižja, ker obstaja večja verjetnost, da smo uporabili mrtev spermij. Sledi vbrizganje spermija v jajčno celico. Z držalno mikropipeto s pomočjo podpritiska držimo jajčece na mestu, z drugo, ki je ostrejša in v kateri je spermij, pa predremo jajčne ovoje ter sprostimo spermij globoko v citoplazmo jajčne celice (55). ICSI lahko uporabljamo tudi po neuspelem ciklusu IVF na isti jajčni celici, in sicer čim prej po neuspeli osemenitvi (55).

Pri bolnicah s slabo napovedjo za nosečnost lahko vgnezdenje zarodka pospešimo s pomočjo punkcije *zone pellucide* ali s t.i. metodo »Assisted Hatching«. Punkcijo naredimo s kislim sredstvom v mikropipeti ali pa z laserjem (55). Za preimplantacijsko genetsko diagnozo lahko odvzamemo polarno telesce, blastomero zgodnjega zasrodka ali del trofoektoderma iz blastociste. Dobljeni material preiščemo s pomočjo polimerazne verižne reakcije ali fluorescenčne hibridizacije *in situ* (55, 57–59).

Delež nosečnosti na cikel se giblje od 22 do 40%, delež porodov na prenos zarodkov pa 15–29%, odvisno od izvora spermijev in izbora zarodkov (57, 60). Uspeh pri drugih indikacijah je nekoliko nižji kot pri moški neplodnosti, kar kaže na to, da metoda pri ženski neplodnosti ni popolnoma uspešna (55).

Zamrzovanje zarodkov

Problem neuporabljenih zarodkov so rešili z zamrzovanjem (32, 41), ki poteka na Ginekološki kliniki v Ljubljani že od leta 1994.

Pri izboru zarodkov izločimo degenerirane in fragmentirane zarodke, preostale pa prenesemo v zamrzovalne raztopine propandiola in saharoze. Posrkamo jih v posebne slamice za zamrzovanje v določenem zaporedju, tako da je na obeh straneh zarodkov še plast zraka in plast raztopine. Zamrznemo jih v posebnem aparatu s pomočjo tekočega dušika do -190°C . Uporaba krioprotektorjev in hiter padec temperature sta pomembna, da ostane celična voda v obliki mikrokristalov, ki ne poškodujejo celice. Zarodke ogrevamo hitro v padajočih koncentracijah propandiola in saharoze ter pustimo, da mediji z zarodki iztečejo iz slamice. Kakovost zarodkov ocenimo glede na morfološki izgled. Najboljše nato splaknemo in jih do uporabe shranimo v tekočem sredstvu pri 37°C (26, 61).

Zamrzovanje in odmrzovanje zarodkov je ena izmed najzahtevnejših nalog za vsak center IVF. Prvi rezultati zamrzovanja zarodkov po postopku IVF na Ginekološki kliniki v Ljubljani so pokazali, da je bilo po odmrzovanju preživetje morul in blastocist boljše kot pri 2–4 celičnih zarodkih, vsaditev pa slabša. To kaže tudi na pomen ujemanja med stanjem endometrija in razvojnim stadijem zarodkov (62). Podatki v svetovnem merilu iz leta 1995 kažejo na povprečno 16- do 16,5-odstotno preživetje po postopku z uporabo zamrznjenih zarodkov (63).

Za uporabo v kasnejših ciklih IVF ali ICSI lahko zamrzujemo tudi jajčne celice (64), tkivo jajčnikov (65), spermije in tkivo testisov (66).

Prirojene nepravilnosti

Prirojene nepravilnosti oziroma kongenitalne anomalije so vse strukturne napake (prirojene oziroma kongenitalne malformacije, deformacije, disrupcije in displazije), kromosomske nepravilnosti, prirojene napake metabolizma in dedne bolezni (67). V nalogi se bomo poleg kromosomskih nepravilnosti omejili na prirojene malformacije.

Možni mehanizmi nastanka prirojenih nepravilnosti v postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo

Prva vprašanja, ki so se pojavila, so obravnavala oploditev in zgodnji razvoj zarodka

v umetnem okolju, ki bi lahko bila vzrok za različne prirojene napake. Možni mehanizmi prirojenih nepravilnosti pri postopku IVF-ET naj bi bili izključeni naravni mehanizmi izbora, vplivi hormonskega spodbujanja in delovanje fizikalnega ali kemičnega dejavnika okolja (2, 3, 12, 68).

Posamezne študije so hormonsko spodbujanje povezovale z okvaro nevrnalne cevi, pa tudi z Downovim sindromom in anomalijami udov. Raziskave so pokazale, da pri otrocih, rojenih po hormonski stimulaciji, tveganje za prirojene nepravilnosti ni večje. Prav tako se je izkazalo, da pri ženskah, ki so prestale ovarijski hiperstimulacijski sindrom, ni večjega tveganja za rojstvo otroka s prirojenimi nepravilnostmi (68).

Obstajajo dokazi, da ob prehodu skozi ženska spolovila nenormalni spermiji odmirajo in tako ne dosežejo mesta oploditve. Zato bi lahko postopek IVF povečal verjetnost oploditve z nenormalnim spermatozoidom (1, 9, 12, 68). Velika količina spermatozoidov ob stiku z jajčno celico v postopku IVF bi lahko povzročila polispermično oploditev (68), še posebej triploidijo (12). Izpostavitve jajčnih celic in zarodkov suboptimalnim pogojem *in vitro* bi lahko povečala možnost kromosomskega nerazdvajanja (68).

Uvedba postopka ICSI je sprožila vrsto nadaljnjih preiskav (69, 70). S postopkom naj bi bila povezana tveganja pri izločitvi procesa izbora pred nastankom zarodka, uporabi nenormalne sperme, vbrizganju tujega materiala v jajčno celico in mehanskem aktiviranju jajčne celice (1, 13).

Pri uporabi manj zrele sperme, posrkane iz epididimisa ali testisov, so se pojavili dvomi o zadovoljivem procesu zorenja in preoblikovanja DNA (1, 13, 22, 57). Raziskave kažejo, da niti obdelava moške gamete s kemičnimi snovmi niti manipulacija z gametami ne povečujeta možnosti genetskih nepravilnosti pri otroku. ICSI-postopek pri moških z normalnimi spermiji ne kaže večjega deleža malformacij (71). Povečana naj bi bila tudi možnost oploditve nenormalnega jajčeca (72). Uporaba navidezno neoplojenega, a vendarle osemjenega jajčeca v postopku ICSI bi lahko povečala možnost aneuploidije (73).

Uvedba zamrzovanja zarodkov naj bi predstavljala novo izpostavitve zarodkov neprimernim pogojem. Ni dokazov, da bi zamrzovanje povečalo možnost nastanka mutacij (32).

Dejavniki tveganja pri neplodnih parih

Višja starost staršev je najpomembnejši dejavnik tveganja. Višja starost mater je povezana s povečanim tveganjem za kromosomske nepravilnosti pri otrocih (2, 8, 46, 67, 68). Z leti spolne celice degenerirajo in narašča število genetsko nepravilnih zarodkov (25, 27, 42). Povprečna starost porodnic po naravni zanositvi je 27–28 let, po postopku oploditve z biomedicinsko pomočjo pa 33–34 let. Tudi višja starost pri očetu povečuje možnosti za nastanek mutacij, ki se prenesejo na potomce (2). Neplodnost je tudi omenjena kot dejavnik tveganja. Velik delež (8–25 %) neplodnih moških ima kromosomske nepravilnosti, ki jih lahko prenesejo na potomce (55, 74–76). Pokazalo se je, da je velikemu deležu neuspešnih poskusov IVF pripisati krivdo tudi nepravilnostim jajčne celice (9, 77) in da ima 7–8 % parov, ki se zdravijo po postopku ICSI, odkrite kromosomske nepravilnosti (78). Obstaja cela vrsta genetskih dejavnikov, ki lahko povzročijo neplodnost oziroma zmanjšano plodnost parov.

Za večino moških z nizkim številom spermijev velja, da so atrezijo spermijev povzročili varnostni mehanizmi v testisu zaradi motnje na ravni spermatogeneze. Pri procesu ICSI spermiji obidejo varnostne mehanizme izbora v epididimisu in ženskih rodilih (9, 12, 22, 68). Pri moških z zmanjšano plodnostjo je prisotnih več skupin z določeno vrsto nepravilnosti. Ena izmed najpogostejših so azoospermični moški z aneuploidijo spolnih kromosomov 47XXY, ki je povezana s Klinefelterjevim sindromom. Včasih gre tudi za mozaicizem oblike 46XY/47XXY (22, 79). Študije poročajo o večji pojavnosti (1 %) nepravilnosti spolnih kromosomov pri dojenčkih očetov v ICSI-postopku (1, 22). Naslednja skupina so nosilci strukturnih sprememb, kot so uravnotežena in neuravnotežena recipročna translokacija, insercija, inverzija in druge. Približno 4 % moških z nižjim številom spermijev je nosilcev takih nepravilnosti. Tudi če je njihov somatski kariotip brez posebnosti, še vedno obstaja

možnost kromosomskih napak (79). Zaradi translokacij so mogoče trisomije, ki se ponavadi končajo s spontanim splavom. Novorojenčki lahko podedujejo neuravnoteženo translokacijo (22). Tretja skupina so moški z resno okvaro spermatogeneze, ki proizvajajo spermije z diploidnimi spermatozooji, kar vodi v nastanek triploidnega plodu (22, 79). Še posebej pozoren je treba biti pri uporabi spermijev, ki so večji od ostalih in imajo več repkov (79). Četrta skupina so nekateri kromosomsko normalni moški, ki so manj plodni zaradi izgube genov iz kromosoma Y, ki so prvotnega pomena za nadzor spermatogeneze (22, 79). Mikrodelecija DNA-zaporedja na posebnih mestih dolge ročice kromosoma Y je prisotna pri 10 do 15 % vseh moških z zmanjšano tvorbo semena (79). Tovrstna napaka je lahko prisotna pri nekaterih moških z normalno tvorbo semena, kar pomeni, da se lahko deduje recesivno (22). Večina mikrodelecij nastane na novo, kar izniči prednosti kromosomske diagnostike (1). Moški potomec lahko nasledi mikrodelecijo kromosoma Y in neplodnost, ki je povezana z njo (2, 79). Zadnje skupino pa predstavljajo moški s prirojeno odsotnostjo *vas deferens*, pri katerih gre za mutacijo ali delecijo obeh genov za čezmembranski uravnovalec, ki je mutiran pri cistični fibrozi (CFTR). Otroka lahko ob heterozigotni materi za gen CFTR prizadane cistična fibroza (1, 22). Pri ženskah so lahko povzročitelji razne uravnotežene in neuravnotežene translokacije (22, 80). Raziskave so pokazale, da je velik delež (47 %) jajčnih celic kromosomsko nenormalnih v tistih primerih neplodnosti, kjer so neuspeh postopka prvotno pripisali moškimi dejavnikom (77).

Drugi dejavniki tveganja

Mnogoplodne nosečnosti so po postopku IVF/ET okoli dvajsetkrat pogostejše (35, 38, 48, 53, 81), pri mnogoplojdnih nosečnostih pa je tudi večja verjetnost prirojelih nepravilnosti.

Otroci, rojeni po postopku oploditve z biomedicinsko pomočjo, so ponavadi natančneje opazovani kot otroci, rojeni po naravni zanositvi, zaradi česar se odkrije več manjših nepravilnosti (32, 49, 82-84).

Preiskave zarodkov

Splav predstavlja naravni način odstranjevanja kromosomsko nepravilnih zarodkov (22, 85-87). Kromosomske preiskave zgodnjih spontano splavljenih zarodkov po naravni zanositvi so pokazale kromosomske spremembe v 60%. Splavi so po IVF postopku pogostejši (20-30%) kot po naravni zanositvi (15%) (25, 33, 49). Neplodni pari s slabo napovedjo zanositve imajo velik delež kromosomsko nenormalnih zarodkov (85).

Pri nas narejena preiskava zarodkov po spontanem splavu v zgodnji nosečnosti po IVF-oploditvi je pokazala citogenetske spremembe pri 64% zarodkov. Od tega je bilo 76% trisomij, medtem ko jih je po naravni zanositvi 50 do 60%. To bi lahko razložili z višjo starostjo matere, saj se posamezne vrste trisomij po umetni oploditvi ne razlikujejo od tistih po naravni. Triploidnih zarodkov je bilo v raziskavi manj (5%) kot po naravni zanositvi (18-20%), verjetno zato, ker so triploidne zarodke spoznali in odstranili že pred prenosom v maternico. Sicer pa naj bi bilo tveganje za triploidijo po umetni oploditvi večje zaradi različnega stadija jajčnih celic po hormonski stimulaciji in možnosti oploditve jajčne celice z več spermiji. Tetraploidnih je bilo v obeh skupinah 10%. Mozaični zarodki so bili pogostejši kot po naravni zanositvi, verjetno zaradi prenosa več zarodkov, saj mnogoplodne nosečnosti povečujejo verjetnost odkritja mozaičizma v splavku (88).

V nekatere raziskave pa so celo ugotavljajo manjše število kromosomskih aneuploidij po spontanem splavu v zarodkih po postopku IVF in ICSI kot v zarodkih po naravni zanositvi in zanositvi s pomočjo znotrajmaternične osemenitve (89).

Narejene so bile številne preiskave predvsaditvenih zarodkov. Kromosomske preiskave teh zarodkov so pokazale nenormalnosti v 22,5% (90). Preiskave zarodkov slabe kakovosti po IVF oploditvi pa so pokazale kromosomske nepravilnosti v 90% (86).

Narejene so bile tudi preiskave zarodkov v zgodnji nosečnosti s pomočjo biopsije horionskih resic in amniocentezo pri nosečnicah po postopku IVF/ET. V celicah, dobljenih z amniocentezo, niso našli nič več kromosomskih nepravilnosti po postopku IVF/ET kot po naravni zanositvi. Kromosomske nepravil-

nosti so bile pogostejše po biopsiji horionskih resic po postopku IVF/ET kot po naravni zanositvi. Pojav so razložili s hipotezo izginja-jočih dvojčkov, pri kateri naj bi resorbcija enega izmed plodov za seboj pustila citogenetsko mešano posteljico (91).

Prizadevanje po zmanjševanju števila nepravilnosti pri zarodkih napredujejo v smeri novejših in boljših medijev za gojitev, boljša pa je tudi nadzor čistoče okolja (zraka in vode). Poleg tega se vedno bolj uporabljajo zarodki iz podaljšanih kultur v stadiju blastociste. To je koristno iz več razlogov. Prvič, mnogi genetsko nepravilni zarodki se do te faze sploh ne razvijejo, drugič, morfološka ocena zarodka je olajšana in v maternico prenesemo le bolj kakovostne zarodke in, tretjič, omogočena nam je izvedba biopsije blastociste in predvsaditvena genetska diagnoza (22, 39, 87).

Genetska diagnoza

Glede na genetske dejavnike, ki lahko povzročijo neplodnost, se moramo vprašati po potrebi genetskih preiskav pri neplodnih parih. Naj bi preiskali vse partnerje za vse genetske nepravilnosti? Naj omejimo preiskave samo na tiste z večjim tveganjem?

Za klasično predrojstveno kromosomsko diagnozo so indikacije skrbno pretehtane, saj se celice za preiskavo dobijo s pomočjo invazivnih posegov (amniocenteza, biopsija horionskih resic, kordocenteza in pozna biopsija posteljice), ki povečujejo možnost spontanega splava. Nekateri raziskave v tujini kažejo, da se le vsak tretji par odloči za to možnost (73). Nekateri avtorji priporočajo kromosomske preiskave očetov v ICSI-postopku (14, 79), drugi pa obeh partnerjev, udeleženih v ICSI-postopku (22). Za preiskave z metodami rekombinantne DNA se pri nas odločijo pri monogeniski bolezni otroka ali enega od staršev (92). Razvoj tehnik mikromanipulacije z biopsijo zarodka, fluorescenčne hibridizacije in situ in polimerazne verižne reakcije so omogočile predvsaditveno genetsko diagnozo (22, 93, 94). Izvedemo jo, kadar presejalni testi pokažejo, da obstaja genetski vzrok za neplodnost. Indikacije zanjo so podobne kot za kromosomske preiskave. Z metodo določimo kromosomsko strukturo ali mutacijo določenega gena zarod-

ka že pred vnosom v maternico v postopku IVF. Na tak način se lahko izognemo prenosu resne genetske nepravilnosti ali pa prekinitve nosečnosti v njenem kasnejšem poteku (22). Material za preiskavo dobimo z biopsijo polarnega telesca (58), z biopsijo ene ali dveh blastomer 3 dni starega zarodka (39, 57) ali z biopsijo nekaj celic trofoektoderma blastociste iz podaljšane kulture (95). Predvsem pri starejših bolnicah s slabo napovedjo in velikim številom neuspešnih poskusov IVF lahko tako s predvsaditveno genetsko diagnozo povečamo možnost vsaditve (22).

Preprečevanje prirojenih nepravilnosti

Še vedno obstajajo tveganja za nastanek določenih vrst nepravilnosti. Zato se je priporočljivo držati naslednjih načel:

- skrbna diagnostična obravnava parov pred postopkom (80);
- vzdrževanje sterilnosti in optimalne sestave sredstev v laboratoriju (22);
- zmanjševanje možnosti nastanka večplodne nosečnosti, pri katerih so prirojene nepravilnosti pogostejše (48, 82–84);
- prenos zarodkov iz podaljšane kulture (22, 39);
- uporaba predvsaditvene tehnike in drugih tehnik genetske diagnoze (22).

NAMEN RAZISKAVE

Namen naloge je ugotoviti, ali so prirojene nepravilnosti pri novorojenčkih, rojenih po postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo, pogostejše kot pri novorojenčkih, rojenih po spontani zanositvi.

Predpostavili smo, da:

- kromosomske, strukturne in letalne nepravilnosti pri novorojenčkih, rojenih po postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo, niso pogostejše kot pri novorojenčkih, rojenih po spontani zanositvi;
- kromosomske, strukturne in letalne nepravilnosti pri novorojenčkih, rojenih po postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo, niso pogostejše kot pri novorojenčkih, rojenih po spontani zanositvi, katerih matere smo po starosti, pariteti, številu plodov in letu poroda izenačili z materami študijske skupine;

- deleži prirojenih nepravilnosti v skupini novorojenčkov s prirojenimi nepravilnostmi, rojenih po postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo, se ne razlikujejo od deležev prirojenih nepravilnosti v skupini novorojenčkov s prirojenimi nepravilnostmi, rojenih po spontani zanositvi;
- starost, pariteta, število plodov in oploditev po postopku ICSI niso dejavniki tveganja za rojstvo novorojenčka s prirojeno nepravilnostjo pri materah, zdravljenih s postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo.

PRESKOVANCI IN METODE DELA

Študijske in kontrolne skupine preiskovancev

V raziskavo smo vključili 242.164 novorojenčev, ki so se rodili 241.607 materam, in sicer po spontani zanositvi in po oploditvi s postopkom IVF-ET od aprila 1987 do decembra 1997 v Sloveniji. Po postopku IVF-ET jih je 742 rodilo v porodnišnici v Ljubljani, 29 v porodnišnici v Celju, 17 v porodnišnici v Šempetru, 20 v porodnišnici v Murski Soboti, 16 v porodnišnici v Trbovljah, 20 v porodnišnici v Kranju, 21 v porodnišnici v Izoli, 4 v porodnišnici na Jesenicah, 14 v porodnišnici v Novem mestu, 9 v porodnišnici v Brežicah, 9 v porodnišnici na Ptujju, 30 v porodnišnici v Slovenj Gradcu, 144 v porodnišnici v Mariboru in 26 v porodnišnici v Postojni. Naša retrospektivna raziskava je kohortna, nadzorovana in opisna.

Pojavnost posameznih vrst prirojenih nepravilnosti – primerjava s splošno populacijo

ŠTUDIJA 1 je kohortna in primerja pojavnost nepravilnosti v naslednjih dveh skupinah:

- *v študijski skupini 1 (IVF 1)* – 1404 novorojenčkov, ki so se rodili po oploditvi s postopkom IVF-ET;
- *v kontrolni skupini 1 (kontrola 1)* – celotna slovenska kohorta 240.760 novorojenčkov, rojenih po naravni zanositvi.

Pojavnost posameznih vrst prirojenih nepravilnosti – primerjava z izbrano populacijo

ŠTUDIJA 2 je nadzorovana in primerja pojavnost nepravilnosti v naslednjih dveh skupinah:

- *v študijski skupini 2 (IVF 2)* – 1270 novorojenčkov, ki so se rodili po oploditvi s postopkom IVF-ET;
- *v kontrolni skupini 2 (kontrola 2)* – 1270 novorojenčkov, ki so se rodili po spontani zanositvi, katerih matere smo po starosti, pariteti, mnogoplodnosti in letu poroda izenačili z materami preiskovane skupine 2 (134 materam po zanositvi s postopkom IVF-ET nismo mogli najti para zaradi pomanjkanja mnogoplodnih nosečnosti v naravni populaciji, zato smo jih iz študije izpustili).

Pojavnost nepravilnosti glede na način oploditve

ŠTUDIJA 3 je kohortna in primerja pojavnost nepravilnosti v naslednjih dveh skupinah novorojenčkov s prirojenimi nepravilnostmi:

- *v študijski skupini 3 (IVF 3)* – 73 novorojenčkov s prirojenimi nepravilnostmi, rojenih po postopku IVF-ET;
- *v kontrolni skupini 3 (kontrola 3)* – 9685 novorojenčkov s prirojenimi nepravilnostmi, rojenih po spontani zanositvi.

Možni dejavniki tveganja za rojstvo novorojenčka s prirojeno nepravilnostjo

ŠTUDIJA 4 je kohortna in primerja dve skupini mater, ki so zanosile po postopku IVF-ET:

- *študijsko skupino 4* – 54 mater novorojenčkov s prirojenimi nepravilnostmi, ki so zanosile po postopku IVF-ET;
- *kontrolno skupino 4* – 1049 mater novorojenčkov brez prirojenih nepravilnosti, ki so zanosile po postopku IVF-ET.

Zbiranje in obdelava podatkov

Raziskava je retrospektivna. Podatke o bolnicah smo dobili iz več virov. Seznam 1331 žensk, ki jim je bil narejen poseg IVF-ET, od tega 35 žensk, ki so jih zdravili s postopkom ICSI, smo dobili iz računalniške zbirke podatkov v Laboratoriju IVF-ET v Ljubljani. Tu smo dobili tudi podatke o načinu indukcije ovu-

lacije in zamrznjenih zarodkih. Podatke o številu in vrstah nepravilnosti, gestacijski starosti in teži novorojenčkov ter starosti mater smo dobili iz Perinatalnega informacijskega sistema Slovenije. Ker porod po postopku IVF-ET včasih ni zabeležen v sistemu, smo si pomagali s porodnimi knjigami in zapisniki iz vseh slovenskih porodnišnic. Naloga vsebuje le preverjene podatke. Za 114 bolnic, ki so jim naredili poseg drugje, podatkov o postopku nismo mogli dobiti. Zaradi sprememb priimkov mater in dejstva, da nekatere niso rodile v Sloveniji, 175 porodov nismo mogli izslediti. Od štirih smo uspeli izslediti le en porod po prenosu odmrznjenega zarodka.

Statistično obdelavo vseh podatkov smo opravili na osebnem računalniku s pomočjo statističnega programskega paketa SPSS 6.1. Rezultate smo ovrednotili s testom hi-kvadrat za neparametrične in t-testom za parametrične spremenljivke. Razlike med vzorci smo imeli za statistično značilne, kadar je bila stopnja tveganja (vrednost p) manjša od 0,05 ($p < 0,05$). V tabelah smo označevali statistično značilnost s številko, statistično značilne razlike pa smo poudarili s krepkim tiskom.

Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravstvo Republike Slovenije (glej priložo).

Izvedba postopka oploditve

Preiskovanke so dobivale dve vrsti spodbujanja: gonadotropinsko spodbujanje in kombinacijo gonadotropinskega spodbujanja z analogi GnRH.

Gonadotropinsko spodbujanje je dobivalo 619 preiskovank, kombinacijo gonadotropinov s klomifenom pa 23 preiskovank. Dobivale so preparat Pergonal (hMG) po 2 do 3 ampule

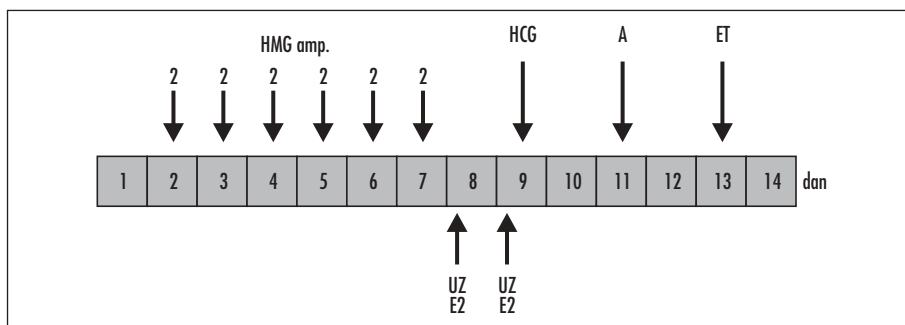
od drugega dne ciklusa. V vsaki ampuli je 75 I. E. folikle stimulirajočega hormona (FSH) in 75 I. E. luteinizirajočega hormona (LH). Rast foliklov so spremljali ultrazvočno in z merjenjem serumske koncentracije estradiola. Pred ovulacijo so preiskovanke dobile še 5000 do 10.000 I. E. hCG. 1 do 3 dni kasneje so s tehniko skozi nožnico pod ultrazvočno kontrolo vsrkali jajčne celice (slika 1).

Pri 37 bolnicah so uporabili preparat Metrodin[®], ki je bolj prečiščen HMG in ima večjo vsebnost FSH. Prejšnji shemi se dodaja prve 3 dni, če so bila poprejšnja spodbujanja pri bolnici neuspešna.

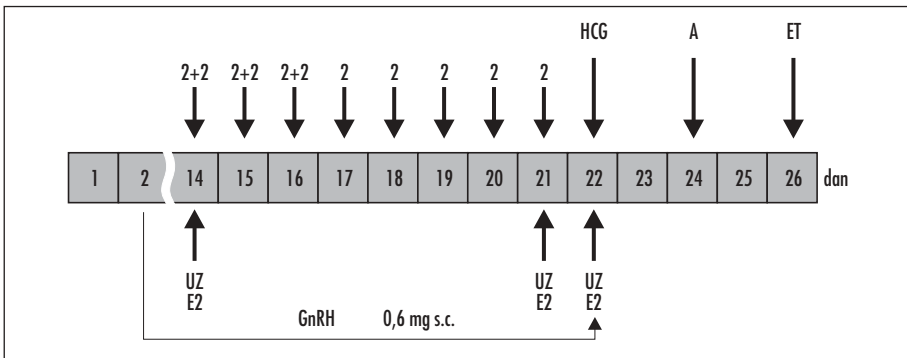
Spodbujanje z analogi GnRH so uporabili pri 272 bolnicah. Preparati, ki so jih uporabili, se imenujejo Suprefact[®], Zoladex[®] in Decepeptyl[®]. Suprefact se uporablja najpogosteje, Decepeptyl pa ima največji učinek. Dajemo jih lahko v folikularni ali lutealni fazi ciklusa po 0,6 do 0,9 mg na dan. Po 14 dneh bolnica dobi še dnevni odmerek HMG, postopek pa se potem nadaljuje po istem vzorcu kot pri gonadotropinskem zdravljenju (slika 2).

Pri 38 naših bolnicah so dnevno vbrizgali 0,6 ml Suprefakta[®] v podkožje od 2. dne dalje kakih 14 dni vsak dan (do ovarijske desenzibilizacije), nato pa uporabili Pergonal[®] v 2 do 4 ampulah na dan in nadaljevali kot pri gonadotropinskem ciklu. Analoge GnRH lahko uporabimo tudi od 22. dne ciklusa dalje, vendar vmes nastopi menstruacija. Po prenosu zarodkov (ET) je obvezno lutealno nadomeščanje, zato bolnica dobiva HCG od dneva ET še 4–10 dni. Pri 8 bolnicah so uporabili preparat Decepeptyl[®], pri 12 pa Zoladex[®].

Po indukciji je sledila aspiracija v 10–16 ali v 24–28 dneh po začetku ciklusa, odvisno od



Slika 1. Spodbujanje jajčnikov s človeškim menopavznim gonadotropinom (HMG) in človeškim horionskim gonadotropinom (HCG).



Slika 2. Spodbujanje jajčnikov z analogi gonadotropine sproščujočim hormonom (GnRH), človeškim menopavznim gonadotropinom (HMG) in človeškim horionskim gonadotropinom (HCG).

dneva začetka zdravljenja. Prenos zarodka je večinoma sledil 2 dni kasneje, pri 66 bolnicah 4 dni kasneje. Prenešenih je bilo 1 do 6 zarodkov. Povprečno so prenesli vsaki bolnici po 3,22 zarodkov.

Pri petintridesetih ženskah, ki so bile zdravljene s postopkom ICSI, smo uporabili kombinacijo GnRH (preparat Zoladex® ali Suprefact®) in gonadotropinov (preparat Pergonal® ali Metrodin®). Prenesenih je bilo 1 do 4 zarodkov na ciklus, povprečno 2,06 vsaki bolnici.

Zamrznjenih je bilo 10 zarodkov pri 4 ženskah, povprečno 2,5 zarodkov pri vsaki. Propadel je 1 zarodek. V ciklusu so prenesli 1 do 4 zarodke.

Vsem ženskam so naredili od 1 do 14 poskusov zdravljenja, povprečno 3,01 poskusov vsaki.

Opazovane spremenljivke

Splošne značilnosti: gestacijska starost in porodna teža novorojenčkov (gestacijska starost je podana v tednih, ki so minili od zadnje menstruacije, preverjena z ultrazvokom do 20. tedna nosečnosti), mrtvorojenost (delež mrtvih plodov nad 500 g, izraženo v promilih (‰) od vseh živo- in mrtvorojenih), število plodov ter starost in pariteta mater.

Prirojene nepravilnosti smo opredelili s pomočjo 9. izdaje Mednarodne klasifikacije bolezni (96) za leta 1987–1996 in 10. izdaje Mednarodne klasifikacije bolezni (97) za leto 1997 (glej prilogo): prirojene kromosomske nepravilnosti, prirojene strukturne nepravilnosti (malformacije živčevja, čutil, srca in obtočil, dihal, prebavil, mišično-ske-

letnega sistema in urogenitalnega trakta) ter prirojene letalne nepravilnosti (opredelili smo jih kot nepravilnosti, ki so bile navedene kot vzrok smrti v listu novorojenčka (98)).

Kot možne dejavnike tveganja smo obravnavali starost matere, število plodov, pariteto in oploditev po postopku ICSI.

REZULTATI

Opis skupin preiskovancev

Pri primerjavi skupin IVF in kontrolnih skupin sta bili povprečna gestacijska starost in porodna teža novorojenčkov značilno nižji v skupinah IVF. Razlika v deležu mrtvorojenih ni bila značilna pri nobeni primerjavi. Pri primerjavi skupine IVF 1 in kontrolne skupine 1 ter skupine IVF 3 in kontrolne skupine 3 je bilo značilno več mnogoplodnosti, povprečne starosti mater in števila ter deleža prvorodk v skupinah IVF. Podatke prikazuje tabela 1.

Pojavnost prirojenih nepravilnosti - primerjava s splošno populacijo

Pri pojavnosti malformacij srca in obtočil, dihal, letalnih nepravilnosti in vseh nepravilnosti smo pri primerjavi med skupino IVF 1 in kontrolno skupino 1 našli značilno višje vrednosti v skupini IVF 1. Pojavnost malformacij mišično-skeletnega sistema je bila v skupini IVF značilno nižja. Pri primerjavi pojavnosti kromosomskih nepravilnosti značilne razlike med obema skupinama nismo našli. Primerjave prikazuje tabela 2.

Tabela 1. Opis skupin preiskovancev in njihovih mater.

	IVF-1	Kontrolna skupina 1	p	IVF-2	Kontrolna skupina 2	p	IVF-3	Kontrolna skupina 3	p
NOVOROJENČKI									
Gestacijska starost									
povprečje [tedni]	36,5	39,2	0,000	37,5	38,3	0,000	34,9	38,8	0,000
Porodna teža									
povprečje [g]	2741	3350	0,000	2852	2950	0,002	2239	3251	0,000
Mrtvorajenost									
število	17	1360	0,350	12	14	0,693	2	137	0,341
delež [%]	1,2	0,6		0,9	1,1		2,7	1,4	
Mnogoplodnost									
število	263	2520	0,000	215		1,000	32	245	0,000
delež [%]	23,8	1,1		20,4			43,8	2,5	
MATERE									
Starost									
povprečna starost [leta]	32,8	26,3	0,000	32,9		1,000	35,6	26,5	0,025
Rodnost									
prvorodke [n]	927	112961	0,000	855		1,000	43	9743	0,000
prvorodke [%]	84,0	47,4	0,000	81,0		1,000	79,6	49,6	0,000

Tabela 2. Pojavnost prirojenih nepravilnosti – primerjava skupine preiskovank v študijski skupini 1 (IVF 1) in kontrolne skupine 1.

	IVF 1 n = 1404	Kontrole 1 n = 240,760	IVF 1 [%]	Kontrole 1 [%]	p
Kromosomske nepravilnosti	4	282	0,3	0,1	0,068
Strukturne nepravilnosti					
Malformacije živčevja	5	434	0,4	0,2	0,122
Malformacije čutil	1	101	0,1	0	0,594
Malformacije srca in obtočil	13	894	0,9	0,4	0,001
Malformacije dihal	4	225	0,3	0,1	0,020
Malformacije prebavil	9	837	0,6	0,3	0,063
Malformacije mišično-skeletnega sistema	8	2847	0,6	1,2	0,034
Malformacije urogenitalnega trakta	13	2377	0,9	1,0	0,817
Letalne nepravilnosti	10	496	0,8	0,2	0,006
SKUPAJ	73	9685	5,2	4,0	0,025

Pojavnost prirojenih nepravilnosti - primerjava z izbrano populacijo

Razlike v kromosomskih, strukturnih in letalnih nepravilnosti pri primerjavi med skupino IVF 2 in kontrolno skupino 2 niso bile značilne. Primerjave prikazuje tabela 3.

Pojavnost prirojenih nepravilnosti glede na način oploditve

Pri primerjavi med skupino IVF 3 in kontrolno skupino 3 je bilo značilno več malformacij srca in obtočil ter letalnih nepravilnosti v skupini IVF 3. Pri primerjavi drugih nepravilnosti

Tabela 3. Pojavnost prirojenih nepravilnosti – primerjava skupine IVF 2 in kontrolne skupine 2.

	IVF 2 n = 1270	Kontrole 2 n = 1270	IVF 2 [%]	Kontrole 2 [%]	p
Kromosomske nepravilnosti	4	1	0,3	0,1	0,179
Strukturne nepravilnosti					
Malformacije živčevja	3	4	0,2	0,3	0,705
Malformacije čutil	1	1	0,1	0,1	1,000
Malformacije srca in obtočil	11	10	0,9	0,8	0,827
Malformacije dihal	2	0	0,2	0,0	0,157
Malformacije prebavil	5	5	0,4	0,4	1,000
Malformacije mišičnoskeletnega sistema	8	9	0,6	0,7	0,808
Malformacije urogenitalnega trakta	12	23	0,9	1,8	0,061
Letalne nepravilnosti	7	6	18,9	20,7	0,858
SKUPAJ	59	65	4,6	5,1	0,581

Tabela 4. Pojavnost prirojenih nepravilnosti v skupini novorojenčkov s prirojenimi nepravilnostmi glede na način oploditve – primerjava skupine IVF 3 in kontrolne skupine 3.

	IVF 3 n = 73	Kontrole 3 n = 9685	IVF 3 [%]	Kontrole 3 [%]	p
Kromosomske nepravilnosti	4	282	5,5	2,9	0,195
Strukturne nepravilnosti					
Malformacije živčevja	5	434	6,8	4,5	0,331
Malformacije čutil	1	101	1,4	1,0	0,784
Malformacije srca in obtočil	13	891	17,8	9,2	0,011
Malformacije dihal	4	212	5,5	2,2	0,057
Malformacije prebavil	9	837	12,3	8,6	0,265
Malformacije mišičnoskeletnega sistema	8	2847	11,0	29,4	0,001
Malformacije urogenitalnega trakta	13	2377	27,8	24,5	0,183
Letalne nepravilnosti	10	496	15,1	4,5	0,006

značilnih razlik nismo našli. Primerjave prikazuje tabela 4.

Pri novorojenčkih v skupini IVF 3 smo našli naslednje letalne nepravilnosti: en Downov sindrom in en Pataujev sindrom, dve koarktaciji aorte, dva sindroma hipoplazije levega srca, tri nepravilnosti diafragme (v enem primeru v kombinaciji s hipoplazijo pljuč) in en anencefalus.

Možni dejavniki tveganja za rojstvo novorojenčka s prirojeno nepravilnostjo

Pri primerjavi študijski skupine 4 in kontrolne skupine 4 nismo našli značilnih razlik. Primerjave prikazuje tabela 5.

Pri analizi postopka ICSI kot dejavnika tveganja smo primerjali novorojenčke mater študijske skupine 4 in kontrolne skupine 4. Povprečna gestacijska starost novorojenčkov v študijski skupini 4 je bila 34,9 tednov, v kontrolni skupini pa 36,6 tednov. Povprečna porodna teža v študijski skupini 4 je bila 2239,0 gramov, v kontrolni skupini 4 pa 2768,5 gramov. Razlika je bila pri obeh primerjavah značilna ($p = 0,000$), z nižjimi vrednostmi v študijski skupini 4. Delež mrtvorojenih je bil v študijski skupini 2,7%, v kontrolni skupini pa 1,1%. Pri primerjavi razlika ni bila značilna ($p = 0,220$).

Pri novorojenčkih, rojenih po postopku ICSI, smo našli 4 prirojene nepravilnosti, in sicer kriptorhizem, odprt duktus arteriosus

Tabela 5. *Možni dejavniki tveganja za rojstvo novorojenčka z nepravilnostjo – primerjava študijske skupine 4 in kontrolne skupine 4.*

		Študijska skupina 4 n = 54	Kontrole 4 n = 1049	p
Povprečna starost mater	[leta]	33,6	32,9	0,222
Pariteta mater				
Prvorodke	[n]	43	833	0,365
	[%]	79,6	84,3	
Mnogoplodna nosečnost				
	[n]	23	250	0,968
	[%]	24,1	23,8	
Oploditev z ICSI		n = 73	n = 1331	
	[n]	4	69	0,081
	[%]	5,5	5,0	

(rojen v 30. tednu), razcep ustnice in neba ter deformacijo stopala.

RAZPRAVLJANJE

Pojavnost prirojenih nepravilnosti – primerjava s splošno populacijo

Predpostavili smo, da prirojene nepravilnosti pri novorojenčkih, rojenih po postopku oploditve z biomedicinsko pomočjo, niso pogostejše kot pri novorojenčkih, rojenih po spontani zanositvi.

Pojavnost vseh prirojenih nepravilnosti skupaj je bila v skupini IVF značilno večja kot v splošni populaciji, kar se ne ujema z ugotovitvami večine tujih preiskav (8, 10, 84). V svetovnih študijah nosečnosti IVF večinoma poročajo o 2 do 3 % pojavnosti prirojenih nepravilnosti v skupinah IVF (1, 2), nekatere celo o 1 % (99), pri nas pa je pojavnost 5,2 %. Nekatere avstralske, novozelandske in italijanske raziskave so odkrile večjo pojavnost prirojenih nepravilnosti pri svojih novorojenčkih, rojenih po postopku IVF-ET (100–102). V skupini IVF smo ugotovili tudi značilno več malformacij srca in obtočil, malformacij dihal ter letalnih nepravilnosti kot v splošni populaciji. Značilno več malformacij dihal, srca in obtočil so našli tudi avstralski, novozelandski in italijanski avtorji (102, 103). Podobnih primerjav za letalne nepravilnosti v tuji literaturi nismo zasledili.

Malformacij mišično-skeletnega sistema je bilo pri primerjavi skupine IVF in splošne populacije značilno manj v skupini IVF.

Morin in sodelavci (6) pri podobnih primerjavah značilnih razlik niso našli, medtem ko druga evropska poročila kažejo manjšo pojavnost tovrstnih malformacij v splošni populaciji (0,1 %) (104).

V naši raziskavi nismo našli značilno več kromosomskih nepravilnosti v skupinah IVF. Svetovna poročila (105) poročajo o 0,2 % pojavnosti tovrstnih nepravilnosti v skupinah IVF, kar je primerljivo z našimi ugotovitvami (0,3 %). V skupinah IVF nismo našli značilno več malformacij živčevja, čutil, prebavil in urogenitalnega sistema. Pojavnost omenjenih malformacij v skupinah IVF je primerljiva s pojavnostjo v tujih študijah, kjer razlike prav tako niso značilne (8, 83, 84, 99).

Pojavnost prirojenih nepravilnosti – primerjava z izbrano populacijo

Predpostavili smo, da prirojene nepravilnosti pri novorojenčkih, rojenih po postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo, niso pogostejše kot pri novorojenčkih, rojenih po spontani zanositvi, katerih matere smo po starostih, pariteti, mnogoplodnosti in letu poroda izenačili z materami študijske skupine.

V skupini IVF smo našli značilno več mnogoplovnih nosečnosti in prvorodk ter značilno starejše matere. Ker nas je zanimal vpliv omenjenih dejavnikov, smo matere obeh skupin izenačili po starosti, pariteti, mnogoplodnosti in letu poroda. Pri primerjavi tako dobljene skupine IVF in izenačene kontrolne skupine nismo našli značilnih razlik v pojavnosti katerekoli nepravilnosti.

Podobne rezultate so v kontroliranih študijah dobili tudi Morin s sodelavci) in (6) drugi tuji avtorji (7, 83, 84, 99), medtem ko so Angleži (8) v podobni študiji pri svoji skupini IVF našli značilno več kromosomskih nepravilnosti in malformacij urogenitalnega sistema.

Pojavnost prirojenih nepravilnosti glede na način oploditve

Predpostavili smo, da prirojene nepravilnosti v skupini novorojenčkov s prirojenimi nepravilnostmi, rojenih po postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo, niso pogostejše kot pri novorojenčkih s prirojenimi nepravilnostmi, rojenih po spontani zanositvi.

Pri primerjavi novorojenčkov s prirojenimi nepravilnostmi, rojenih po postopku IVF-ET, in novorojenčkov s prirojenimi nepravilnostmi, rojenih po spontani zanositvi, je bil delež malformacij srca in obtočil ter usodnih nepravilnosti značilno večji v skupini IVF. Tuje študije (10, 84, 99) poročajo o 14 do 20% malformacij srca pri svojih skupinah IVF, kar je primerljivo z našo skupino IVF (17,8%). Malformacije srca in obtočil so pomembne tudi zato, ker so bile štiri od desetih letalnih nepravilnosti v naši raziskavi ravno malformacije te vrste. Do podobnih zaključkov so prišli tudi v ameriških raziskavah (83).

V skupini novorojenčkov z nepravilnostmi po postopku IVF-ET smo ugotovili značilno manj malformacij mišično-skeletnega sistema. Francoski avtorji (10, 84, 99) poročajo o 8- do 19-odstotnem deležu tovrstnih malformacij v skupinah IVF, kar je primerljivo z našimi rezultati (11%).

Med skupino novorojenčkov s prirojenimi nepravilnostmi, rojenih po postopku IVF-ET, in skupino novorojenčkov s prirojenimi nepravilnostmi rojenih po spontani zanositvi, nismo našli značilnih razlik v deležu kromosomskih nepravilnosti, malformacij živčevja, čutil, dihal, prebavil in urogenitalnih malformacij. Francoski avtorji poročajo o 5- do 6-odstotnem deležu kromosomskih nepravilnosti (84, 99), kar je primerljivo z našo skupino IVF (5,5%), medtem ko so nekatere druge študije (10) našle večji delež tovrstnih nepravilnosti (23%). Prav tako so našli 6 do 12,5% malformacij živčevja, 5 do 12% mal-

formacij prebavil in 14 do 20% urogenitalnih malformacij v skupinah IVF, kar se ujema z našimi rezultati (10, 84, 99).

Možni dejavniki tveganja za rojstvo otroka s prirojeno nepravilnostjo

Predpostavili smo, da starost, pariteta, mnogoplodnost in oploditev s postopkom ICSI niso dejavniki tveganja za rojstvo novorojenčka s prirojeno nepravilnostjo pri materah, udeleženi v postopku oploditve z biomedicinsko pomočjo.

Primerjava med materami, zdravljenimi s postopkom IVE-ET, ki so rodile novorojenčke s prirojenimi nepravilnostmi, in materami, zdravljenimi s postopkom IVE-ET, ki so rodile novorojenčke brez prirojenih nepravilnosti, ni pokazala značilnih razlik. Od možnih dejavnikov tveganja (starost matere, pariteta, mnogoplodnost in oploditev po postopku ICSI) se znotraj skupine mater, zdravljenih po postopku IVF, ni noben izkazal za pomembnega. Pri iskanju dejavnikov tveganja so podobne rezultate dobili tudi francoski in angleški raziskovalci (8, 10). V nasprotju s številnimi tujimi poročili o postopku ICSI kot dejavniku tveganja za nepravilnosti predvsem spolnih kromosomov (106, 107) nismo pri naši skupini novorojenčkov, rojenih po postopku ICSI, našli niti ene. Nepravilnosti, ki smo jih našli, so bile le nenevarne malformacije. Očitno znotraj skupine zdravljenih mater, poleg znanih dejavnikov tveganja, obstaja še nek drug dejavnik tveganja, ki ga z našo raziskavo ne moremo odkriti. V tej smeri bodo potrebne še nadaljnje raziskave.

ZAKLJUČKI

Postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo ne povečujejo verjetnosti nastanka prirojenih nepravilnosti.

Malformacije srca in obtočil predstavljajo večji delež prirojenih nepravilnosti po oploditvi z biomedicinsko pomočjo kot po naravni oploditvi.

Postopek ICSI se ni izkazal kot dejavnik tveganja za nastanek kromosomskih nepravilnosti.

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujema najinemu mentorju, prof. dr. Tomažu Tomaževiču, dr. med., ki nama je s svojimi idejami, nasveti in spodbudo aktivno pomagal pri premagovanju vseh težav, s katerimi se mladi raziskovalec sreča pri svojem delu, ter nama vlil veselje za nadaljnje delo; somentorici as. dr. Tanji Premru-Sršen, dr. med., ki naju je vpeljala v raziskovalno delo, naučila videti bistvo in nama nudila neprecenljivo vsestransko pomoč;

mag. Ivanu Verdeniku, dipl. ing. elekt., za nesebično pomoč in nasvete pri obsežni obdelavi podatkov;
ing. Brigiti Valentinčič-Gruden, dipl. biol., za neutrudno pomoč pri zbiranju podatkov;
prof. Jožetu Faganelu iz ZRC SAZU za lektoriranje naloge;
ga. Klementi Habjan za pomoč pri brskanju po strokovni literaturi
in vsem najinim bližnjim, ki so zdržali z nama vse do konca.

LITERATURA

1. Tournaye H, Van Steirteghem A. Microinjection. In: Rodriguez-Armas O, Hedon B, Daya S, eds. *Infertility and contraception. A textbook for clinical practice*. New York: Parthenon; 1998. pp. 181-6.
2. Simpson JL. Are anomalies increased after ART and ICSI? In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. pp. 199-209.
3. Schenker JG, Ezra Y. Complication of assisted reproductive techniques. *Fert Ster* 1994; 61: 411-22.
4. Barkai G, Goldman B, Ries L, Chaki R, Dor J, Cuckle H, et al. Down syndrome screening marker levels following assisted reproduction. *Prenat Diagn* 1996; 16: 1111-4.
5. Avrech OM, Merlob PM, Neri A, Kaplan B, Ovadia J, Fisch B, et al. Poland anomaly after in vitro fertilization. *Fert Ster* 1994; 62: 1268-70.
6. Morin NC, Wirth FH, Johnson DH, Frank LM, Presburg HJ, Van den Water VL, Chee EM, et al. Congenital malformations and psychosocial development in children conceived by in vitro fertilization. *J Pediatr* 1989; 115: 222-7.
7. Tan S, Doyle P, Campbell S, Beral V, Rizk B, Brinsden P, et al. Obstetric outcome of in vitro fertilization pregnancies compared with normally conceived pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 778-84.
8. Rizk B, Doyle P, Tan SL, Rainsbury P, Betts J, Brinsden P, et al. Perinatal outcome and congenital malformations in in-vitro fertilization babies from the Bourn-Hallam group. *Hum Reprod* 1991; 6: 1259-64.
9. Monduelle M, Legein J, Derde MP, Buysse A, Van Schietecatte A, Wisanto A, et al. Comparative follow-up study of 130 children born after intracytoplasmic sperm injection and 130 children born after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995; 10: 3327-31.
10. Rufat P, Olivennes F, Mouzou J, Dehan M, Frydman R. Task force report on the outcome of pregnancies and children conceived by in vitro fertilization (France: 1987 to 1989). *Fert Ster* 1994; 61: 324-30.
11. Tejada MI, Mendoza R, Carbonero K, Lizarraga MA, Escudero F, Benito JA, et al. Deletion of chromosome 4: 46, XY, del (4) (q31.3) after gamete intrafallopian transfer and in vitro fertilization-embryo transfer. *Fert Ster* 1990; 54: 953-4.
12. Simpson JL, Liebaers I. Asseeing congenital anomalies after preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13: 170-6.
13. Van Golde R, Boada M, Veiga A, Evers J, Geraedts J, Barri P, et al. A retrospective follow-up study on intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Gen* 1999; 16: 227-32.
14. Munne S, Marquez C, Reing A, Garrisi J, Alikani M. Chromosome abnormalities in embryos obtained after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fert Ster* 1998; 69: 904-8.
15. Andrews MC, Muasher SJ, Levy DL, et al. An analysis of the obstetric outcome of 125 consecutive pregnancies conceived in vitro and resulting in 100 deliveries. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154: 848-54.
16. Morin nc, Wirth FH, Johnson DH, Frank LM, Presburg HJ, Van de Water VL, et al. Congenital malformations and psychosocial development in children conceived by in vitro fertilization. *J Pediatr* 1989; 115: 222-7.
17. Sutcliffe A, D'souza S, Cadman J, Richards B, Mckinlay I, Lieberman B, et al. Outcome in children from cryopreserved embryos. *Arch Dis Child*. 1995; 72: 290-3.
18. Mushin DN, Barreda-Hanson MC, Splensley JC. In vitro fertilization children: early psychosocial development. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1986; 3: 247-52.
19. Yovich LJ, Parry NP, Grauaug AA. Developmental assesment of twenty in vitro fertilization (IVF) infants at their first birthday. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1986; 3: 253-7.
20. Ron El R, Lahat E, Golan A, et al. Development of children born after ovarian superovulation induced by long-acting gonadotrophin - releasing hormone agonist and menotropins, and by in vitro fertilisation. *J Pediatr* 1994; 125: 734-7.
21. Cederblad M, Friberg B, Ploman F, Sjoberg NO, Stjernqvist K, Zackrisson E. Intelligence and behaviour in children born after in-vitro fertilization treatment. *Hum Reprod* 1996; 11: 2052-7.

22. Lundin K, Hanson C, Hamberger L. Are the new microfertilization techniques associated with an increased genetic risk to the offspring? *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77: 792–8.
23. World Health Organisation (CH). WHO Scientific Group on Recent Advances in Medically Assisted Conception. Recent advances in medically assisted conception: report of a WHO scientific group. Geneva: World Health Organisation; 1992. pp. 2–10.
24. Andolšek Jeras L. Neplodnost včeraj in jutri. In: Meden Vrtovec H, ed. *Neplodnost*. Ljubljana: Cankarjeva založba; 1989. pp. 9–14.
25. Lovšin B. Nosečnost po IVF-ET postopku na Ginekološki kliniki v Ljubljani. [specialistično delo]. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1993.
26. Hedon B, Dechaud H, Anahory T, Arnal F, Humeau C. Assisted procreation. In: Rodriguez-Armas O, Hedon B, Daya S, eds. *Infertility and contraception. A textbook for clinical practice*. New York: Parthenon; 1998. pp. 155–80.
27. Meden Vrtovec H, Hren Vencelj H. Zunajtelesna oploditev. In: Meden-Vrtovec H, ed. *Neplodnost*. Ljubljana: Cankarjeva založba; 1989. pp. 343–62.
28. Meden Vrtovec H, Tomažević T, Verdenik I. Uspešnost postopka zunajtelesne oploditve glede na indikacije in vrste ovarijske stimulacije. I. kongres ginekologov in perinatologov; 1996; Portorož, Slovenija.
29. Ribič Pucelj M, Tomažević T, Valentinčič B, Meden Vrtovec H. Kumulativna stopnja nosečnosti v postopku zunajtelesne oploditve. I. kongres ginekologov in perinatologov; 1996; Portorož, Slovenija.
30. Smitz J, Ron El R, Tarlatzis BC. The use of gonadotrophin releasing hormone agonist for in vitro fertilization and other assisted procreation techniques: Experience from three centres. *Hum Reprod* 1992; 7 Suppl 1: 49–66.
31. Bačar Kermanver L, Valentinčič B, Veble A, Virant Klun I, Mivšek J. Zunajtelesna oploditev – potek dela v laboratoriju Ginekološke klinike v Ljubljani. Zbornik operacijskih medicinskih sester Slovenije. Postojna; 1996. pp. 47–8.
32. Sutcliffe AG, Souza SWD, Cadman J, Richards R, McKinlay LA, Lieberman B, et al. Minor congenital anomalies, major congenital malformations and development in children conceived from cryopreserved embryos. *Hum Reprod* 1995; 10: 3332–7.
33. World Health Organisation (CH). WHO Scientific Group on Recent Advances in Medically Assisted Conception. Recent advances in medically assisted conception: report of a WHO scientific group. Geneva: World Health Organisation; 1992. pp. 52–74.
34. Tasdemir M, Tasdemir I, Kodama H, Fukuda J, Tanaka T. Two instead of three embryo transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995; 10: 2155–8.
35. Svendsen TO, Jones D, Butler L, Muasher SJ. The incidence of multiple gestations after in vitro fertilization is dependent on the number of embryos transferred and maternal age. *Fert and Ster* 1996; 65: 561–5.
36. Azem F, Yaron Y, Amit I, et al. Transfer of six or more embryos improves success rates in patients with repeated in vitro fertilization failures. *Fert and Ster* 1995; 63: 1043–6.
37. Vauthier Brouzes D, Lefebvre G, Lesourd S, Gonzales J, Darbois Y. How many embryos should be transferred in in vitro fertilization? A prospective randomized study. *Fert and Ster* 1994; 62: 339–42.
38. Belaisch Allart J, Salat Baroux J, Logerot Lebrun M, De Mouzon J. Grossesses multiples. *Contracept Fertil Sex* 1995; 23: 494–7.
39. Trounson A. New development in human embryology offer a new dimension to clinical reproductive medicine. In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. pp. 39–49.
40. Tomažević T, Geršak K, Meden Vrtovec H, et al. Drugi in četrti dan za prenos zarodka v naravnem ciklusu IVF/ET. I. kongres ginekologov in perinatologov; 1996; Portorož, Slovenija.
41. Tomažević T, Meden Vrtovec H. Reducing the need for selective multifetal pregnancy reduction in IVF/ET. Medically-assisted procreation and the protection of the human embryo. Third simposium on bioethics; 1996; Strasbourg, France. pp. 86–7.
42. Feichtinger W. Results and complications of IVF therapy. *Curr Op Obstet Gynecol* 1994; 6: 190–7.
43. Harrison RF, Hennelly B, Woods T, et al. Course and outcome of IVF pregnancies and spontaneousconception within an IVF setting. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 59: 175–82.
44. Ribič Pucelj M, Tomažević T, Valentinčič B, Meden Vrtovec H. Kumulativna stopnja nosečnosti v postopku zunajtelesne oploditve. I. kongres ginekologov in perinatologov; 1996; Portorož, Slovenija.
45. Pompe-Tanšek M, Kos Gril D. Vpliv starosti ženske na uspešnost IVF-ET postopka. I. kongres ginekologov in perinatologov; 1996; Portorož, Slovenija.
46. Templeton A. Age and fertility (a review of relevant gynaecological issues). In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. pp. 157–65.
47. Gissler M, Silverio MM, Hemminki E. In-vitro fertilization pregnancies and perinatal health in Finland 1991–1993. *Hum Reprod* 1995; 10: 1856–61.
48. Agustsson T, Geirsson RT, Mires G. Obstetric outcome of natural and assisted conception twin pregnancies is similar. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76: 45–9.

49. Barri PN, Tur R, Boada M, Coroleu B. Are multiple pregnancies an inevitable consequence of assisted reproduction techniques? Medically-assisted procreation and the protection of the human embryo; third symposium on bioethics, 1996: Strasbourg, France.
50. Meden Vrtovec H. Indukcija ovulacije. In: Meden-Vrtovec H, ed. *Neplođnost*. Ljubljana: Cankarjeva založba; 1989. pp. 295-9.
51. Tomažević T, Meden Vrtovec H. Early timed follicular aspiration prevents severe ovarian hyperstimulation syndrome. *J Assist Reprod Gen* 1996; 13: 282-6.
52. Brambati B. First trimester fetal reduction: its role in the management of twin and higher order multiple pregnancies. Medically-assisted procreation and the protection of the human embryo; third symposium on bioethics; 1996: Strasbourg, France. pp. 2-24.
53. Logerot Lebrun H, De Mouzon J, Bachelot A, Spira A. Pregnancies and births resulting from in vitro fertilization: French national registry, analysis of data 1986 to 1990. *Fert Ster* 1995; 64: 746-56.
54. Tallo CP, Vohr B, Oh W, Rubin LP, Seifer DB, Haning Jr RV. Maternal and neonatal morbidity associated with in vitro fertilization. *J Pediatr* 1995; 127: 794-800.
55. Wright G, Tucker MJ, Morton PC, Sweitzer Yoder CL, Smith SE. Micromanipulation in assisted reproduction: a review of current technology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998; 10: 221-6.
56. Witt MA. ICSI and the biological sperm reservoir. In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. 429-38.
57. Steirteghem AV, De Vos A, Staessen C, Verheyen G, Aytöz A, Bonduelle M et al. Is ICSI the ultimate ART procedure? In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. pp. 27-38.
58. Verlinsky Y, Cieslak J, Rechitsky S, Ivakhnenko V, Lifchez A, Kuliev A, et al. Polar body biopsy. In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. 213-221.
59. Handyside AH, Thornhill A. Cleavage stage embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis. In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. pp. 223-9.
60. Reproductive medicine. In: Brudenell M, Chamberlain G, Edmonds K, eds. *Gynaecology by tenteachers*. New York: Oxford; 1989. pp. 214-42.
61. Ginekološka klinika Ljubljana. Delovni protokol zamrzovanja zarodkov IVF laboratorija na Ginekološki kliniki Ljubljana.
62. Virant Klun I, Veble A, Valentincič B, et al. Prvi rezultati zamrzovanja zarodkov v postopku zunajtelesne oploditve na Ginekološki kliniki v Ljubljani. I. kongres ginekologov in perinatologov; 1996; Portorož, Slovenija.
63. Anon. 1995 Art world report. Abstract from 10th world congress on IVF and assisted reproduction [abstract]. *J Assist Reprod Gen* 1997; 14 Suppl 5: 258-65.
64. Porcu E, Fabbri R, Savelli L, Petracchi S, Flamingi C. Cryopreservation of human oocyte: state of the art. In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. pp. 599-606.
65. Gosden R, Newton H, Kim SS. The cryopreservation of human ovarian tissue. In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. pp. 615-20.
66. Schulze W, Hohenberg H, Knuth UA. Cryopreservation of testicular tissue: a highly effective method to provide sperm for successful TESE/ICSI procedures. In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. pp. 621-6.
67. EUROCAT (B). European Registration of Congenital Anomalies. Part 1: Text. Surveillance of congenital anomalies in Europe 1980-1992. Brussels: Eurocat Working Group; 1995.
68. Shoham Z, Zosmer A, Insler V. Early miscarriage and fetal malformations after induction of ovulation (by clomiphene citrate and/or human menotropins), in vitro fertilization, and gamete intrafallopian transfer. *Fert and Ster* 1991; 55: 1-11.
69. Cummins JM, Jequier AM. Concerns and recommendations for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment. *Hum Reprod* 1995; Suppl 1: 138-43.
70. Cummins JM. Controversies in science: ICSI may foster birth defects. *J NIH Res* 1997; 9: 37-42.
71. Baschat AA, Schwinger E, Diedrich K. Assisted reproductive techniques-are we avoiding the genetic issues? *Hum Reprod* 1996; 11: 926-8.
72. Bonduelle M, Legein J, Derde MP, Buysse A, Schietecatte J, Wisanto A, et al. Comparative follow-up study of 130 children born after intracytoplasmic sperm injection and 130 children born after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995; 10: 3327-31.
73. Bui T, Wrambsy H. Micromanipulative assisted fertilization-still clinical research. *Hum Reprod* 1996; 11: 925-6.
74. Moosani N, Pattison HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH, et al. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fert Ster* 1995; 64: 811-7.

75. In't Veld PA, Halley DJJ, van Hemel JO, Niermeijer MF, Dohle G, Weber RFA et al. Genetic counselling before intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1997; 350: 490.
76. Martin RH. The risk of chromosomal abnormalities following ICSI. *Hum Reprod* 1996; 11: 924-5.
77. Almeida PA, Bolton VN. The relationship between chromosomal abnormalities in the human oocyte and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1994; 9: 343-6.
78. Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, De Geyter C, Behre HM, Nieschlag E et al. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection-prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Hum Reprod* 1998; 13: 576-82.
79. Chandley AC, Hargreave TB. Genetic anomaly and ICSI. *Hum Reprod* 1996; 11: 930-2.
80. Liebaers I, Bonduelle M, Van Assche E, Lissens W, Devroey P, Van Steirteghem A. How far should we go with genetic screening in assisted reproduction? In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. pp. 247-54.
81. Tomažević T. Mnogoplodna nosečnost po IVF ET. Načini redukcije. Problemi ultrazvoka v perinatologiji II; 1996: Lokve, Slovenija.
82. Brambati B. First trimester fetal reduction: its role in the management of twin and higher order multiple pregnancies. Medically-assisted procreation and the protection of the human embryo; third symposium on bioethics; 1996: Strasbourg, France.
83. Saunder K, Spensley J, Munro J, Halasz. Growth and physical outcome of children conceived by in vitro fertilization. *Pediatrics* 1996; 97: 688-92.
84. FIVNAT. Pregnancies and births resulting from in vitro fertilization: French national registry, analysis of data 1986 to 1990. *Fert Ster* 1995; 64: 746-56.
85. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Garrisi J, Munne S et al. Preimplantation genetic diagnosis increase the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fert Ster* 1997; 68: 1128-31.
86. Pellestor F, Dufour M, Arnal F, Humeau C. Direct assessment of the rate of chromosomal abnormalities in grade IV human embryos produced by in-vitro fertilization procedure. *Hum Reprod* 1994; 9: 293-302.
87. Plachot M. Aneuploidy rates and blastomeres. In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. pp. 711-20.
88. Veble A, Canki Klain N, Debevec M, Gregorič J, Meden Vrtovec H, Tomažević T, et al. Chromosomal analysis of early pregnancy loss in patient after in vitro fertilization. In: Macek Mn, Ferguson-Smith MA, Spala M, eds. *Early fetal diagnosis: Recent Progress and Public Health Impact*. Prague: Kardinum - Charles U Pr; 1992. 90-6.
89. Asch RH, Verez JR, Cerrillo M, Yerena MC, Frush AM, Gtjierrez-Najar AJ, et al. Decreased frequency of chromosomal abnormalities in spontaneous abortions from IVF pregnancies: A prospective controlled ongoing study [abstract]. *Advances in Assisted Reproduction Technologies*; 1997: Rome, Italy.
90. Jamieson ME, Coutts JRT, Connor JM. The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro. *Hum Reprod* 1994; 9: 709-15.
91. In't Veld PA, Van Opstal D, Van Den Berg C, Van Ooijen M, Brandenburg H, Pijpers L et al. Increased incidence of cytogenetic abnormalities in chorionic villus samples from pregnancies established by in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Prenat Diagn* 1995; 15: 975-80.
92. Brezigar A. Genetsko svetovanje. In: Novak Antolič Ž, Pajntar M, eds. *Nosečnost in vodenje porod*. Ljubljana: Cankarjeva Založba; 1994. pp. 32-9.
93. Sermon K. Diagnostic accuracy in preimplantation diagnosis single-cell PCR for mendelian disorders. In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. pp. 687-96.
94. Munne S, Marquez C, Fung J, Bahce M, Morrison L, Weir U, et al. Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy and translocation. In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. 697-710.
95. Carson SA. Blastocyst biopsy. In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and reproductive medicine*. New York: Elsevier; 1998. pp. 231-3.
96. Zdravković M, editor. *Međunarodna klasifikacija bolesti, povreda i uzroka smrti*. Niš: Institut za dokumentaciju zaštite na radu; 1978.
97. *Međunarodna klasifikacija bolezn*i, poškodb in vzrokov smrti. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja; 1996.
98. Zapisnik o novorojenčku. DZS; 1996.
99. FIVNAT (F). French In Vitro National. Analyse des resaultots 1980-1992. Paris: Dossier FIVNAT; 1992.
100. Fertility Society of Australia (AU). In vitro fertilization pregnancies, Australia and New Zealand 1979-1985. Sidney: National Perinatal Statistic Unit, Fertility Society of Australia; 1987.
101. Cohen J, Schatman G, Suzman M, Adler M, Alikani M and Rosenwaks Z. Micromanipulating human gametes. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6: pp. 69-83.

102. Licata D, Garzena E, Mostert M, Farinasso D, Fabris C. Congenital malformations in babies born after assisted conception. *Pediatr Perinat Epidemiol* 1993; 7: 222-4.
103. Lancaster P. Congenital malformations after in vitro fertilization. *Lancet* 1987; ii: 1392.
104. EUROCAT (B). European Registration of Congenital Anomalies. Part 2: Tables. Surveillance of congenital anomalies in Europe 1980-1992. Brussels: Eurocat Working Group; 1995.
105. 7th World Congress on IVF and Assisted Procreation. World Collaborative Report. 1991; Paris, France.
106. Bonduelle M, Aytoz A, Van Assche E. Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 781-2.
107. In't Veld P, Brandenburg C, Gregson N, et al. Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995; 346: 773.

Prispelo 10. 3. 2001