

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Jelena D. Stojnić

ISHODI TRUDNOĆA I STANJA
NOVOROĐENČADI NAKON PRIMENE
METODA ASISTIRANE REPRODUKCIJE

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Jelena D. Stojnić

PREGNANCY AND NEONATAL
OUTCOME AFTER ASSISTED
REPRODUCTIVE TECHNOLOGY

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

MENTOR:

Akademik Prof. Dr. Nebojša Radunović, redovni profesor na Katedri ginekologije i akušerstva Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr. Darko Plećaš, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr. Zoran Krstić, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr. Ivan Tulić, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu, Univerzitet u Beogradu, u penziji

DATUM ODBRANE: _____

Akademiku Profesoru Nebojši Radunoviću, mentoru i mom učitelju, dugujem najveću zahvalnost za nesebičnu pomoć i stalnu podršku, od početka mog bavljenja asistiranom reprodukcijom. Svakodnevna saradnja sa njim predstavlja pravu privilegiju.

Profesoru Darku Plećašu iskreno se zahvaljujem na prijateljskoj, stručnoj i organizacionoj podršci, koju je pružao sve vreme izrade doktorata.

Profesoru Zoranu Krstiću, svesrdno se zahvaljujem na pomoći i podršci, kao i sugestijama prilikom izrade i korekcija ovog rada.

Profesoru Ivanu Tuliću, doajenu tehnike asistirane reprodukcije u Srbiji i načelniku odeljenja ART u Klinici za ginekologiju i akušerstvo KCS, dugujem neizmernu zahvalnost za podršku i edukaciju u svakodnevnom radu asistirane reprodukcije, kao i korisne sugestije i korekcije sadržaja rada.

Podrška, pomoć i nesebični podsticaj moje porodice u toku izrade ovog rada, bili su za mene od najvećeg značaja.

Podršku i stručnu pomoć, uz veliku zahvalnost dugujem svojim prijateljima Katarini Jeremić, Jeleni Jeremić, Jeleni Mladenović, kao i osoblju odeljenja asistirane reprodukcije na Klinici za ginekologiju i akušerstvo KCS.

ISHODI TRUDNOĆE I STANJA NOVOROĐENČADI NAKON PRIMENE METODA ASISTIRANE REPRODUKCIJE

Jelena D. Stojnić

REZIME:

Cilj: Sve veća primena i rasprostranjenost metoda asistirane reprodukcije IVF/ICSI, dovodi i do očekivanog interesovanja o bezbednosti metode i stanju dece iz ovakvih trudnoća. Prvi opšti ciljevi obuhvataju ispitivanje uticaja faktora asistirane reprodukcije na tok i ishod jednoplodnih i blizanačkih trudnoća, kao i trajanje i način završavanja trudnoća, u poređenju sa spontanom populacijom. Drugi deo prvog opšteg cilja obuhvata novorođenče iz ART, njegovo stanje, prisustvo kongenitalnih malformacija, epigenetskih poremećaja, mortaliteta i morbiditeta u odnosu na spontanu populaciju novorođenčadi. Drugi opšti cilj obuhvata poređenje uticaja specifične metode asistirane reprodukcije IVF i ICSI na trudnoće, tok, ishod i pojavu komplikacija u okviru populacije nastale asistiranom reproduktivnom tehnologijom. Takođe, poređenje uticaja vrste metode asistirane reprodukcije IVF ili ICSI na novorođenčad međusobno, nastalih ovim metodama u pogledu njihovog stanja, pojave kongenitalnih malformacija, hromozomopatija, epigenetskih sindroma, kao i mortaliteta i morbiditeta, posebno za jednoplodne i blizanačke trudnoće.

Metodologija: Delom retrospektivna, delom prospektivna studija je sprovedena na Klinici za ginekologiju i akušerstvo, Kliničkog centra Srbije u periodu od 01.01.2001. do 31.12.2011. godine i odnosi se na populaciju 1441 trudnice, starih do 45 godina, porođenih nakon 24. nedelje gestacije sa trudnoćom nastalom IVF i ICSI metodom asistirane fertilizacije, bez prisustva težih i sistemskih bolesti, sa jednoplodnom (881) i blizanačkom trudnoćom (560). Kao kontrola su korišćene trudnice, porođene na KGA KCS u istom vremenskom periodu (u toku istog meseca), odgovarajućeg godišta, obrazovanja, pariteta, sa odgovarajućim brojem plodova, i spontano nastalom trudnoćom, svakoj pojedinačnoj ispitanici je dodeljena pojedinačna kontrola.

Pod postupkom asistirane fertilizacije se podrazumevaju samo sveži ciklusi IVF i ICSI sa embriotransferom, sa celokupnom dokumentacijom. Kod kontrola korišćenje agensa za stimulaciju ovulacije ili intervencije intrauterine inseminacije je isključivalo

definiciju spontano začete trudnoće, i nisu uzimane u obzir.

Podaci o trudnicama i toku trudnoće su prikupljeni uvidom u kompletne medicinske protokole, istoriju bolesti, medicinsku dokumentaciju trudnica i istoriju bolesti neonatusa. Podaci o infertilitetu, kao i postupku ART su dobijeni iz istorija bolesti asistirane fertilizacije i odeljenskih protokola, kao embrioloških protokola. Trudnoće su praćene klinički, laboratorijski i ultrasonografski, ambulantno tretirane i hospitalizovane po potrebi. U sklopu maternalnih komplikacija smo uzimali hipertenzivne poremećaje u trudnoći, gestacijski dijabetes melitus, prisustvo placente previje, PPRM, invazivnu dijagnostiku, aplikovanje serklaža. Fetalna patologija je uključivala poremećaje rasta ploda IUGR, intrauterino uginuće ploda, hormozomopatije, prisustvo kongenitalnih malformacija, intrauterino uginuće ploda. Poređen je i vreme i način završavanja trudnoće, komplikacije, stanje neonatusa sa parametrima, prijem u neonatalnu intenzivnu negu, komplikacije, dužina lečenja, mortalitet i morbiditet.

Statistička analiza je urađena upotrebom IBM SSPS verzija 20.0 za Windows. Podaci su prikazana srednjom vrednošću i standardnom devijacijom za kontinualne varijable, kao i procenti i promili za kategoričke. Za poređenja između grupa koristili smo Studentov T test (parametarski podaci) i Mann Whithney U test (neparametarski podaci) za kontinuirane varijable i Pirsonov test sa Yates korekcijom i Fisherov z test za kategoričke varijable.

Rezultati: Prosečna starost žena u ART jednoplodnim trudnoćama je 35.70 ± 4.28 godina, skoro polovina ima više ili visoko obrazovanje (45.9%) i nuliparitet 94.8%. Više od polovine ART procedura 51.6% je urađen klasičnom IVF metodom u odnosu na 48.4% ICSI metode. Komplikacije u trudnoći se češće javljaju u ART jednoplodnim trudnoća u vidu PIH sa 12.8% u odnosu na 9.0% kod spontanih ($p=0.01$) i gestacijskog dijabetesa (12.2%vs 8.6%), kao im PPRM od 32 -37ng ($p=0.02$).

Prosečna gestacijska starost u kojoj se završavaju ART jednoplodne trudnoće je 5 dana kraća od spontanih sa 38.14 ± 1.82 dana prema 38.65 ± 1.72 , sa većom učestalošću prevremenog porođaja od 32-37ng u ART grupi sa 7.8% ($p=0.01$). Carski rez je dominantni put završavanja ART jednoplodnih trudnoća sa 83.3%, a vaginalni put kod spontanih sa 66.1%, što govori o različitom tertmanu trudnoća ($p=0.001$).

Bebe nastale ART su oko 100 grama lakše od spontanih kontrola sa tm prosečno 3198.37 ± 596.11 grama prema 3350.00 ± 560.00 grama, uz značajno veći rizik rađanje

deteta sa masom ispod 2500 gr ($p=0.01$). Značajno više ima dece u ART jednoplodnoj grupi sa Ap manjim od 7 u 1 minuti sa 14.1% nego kod spontanih 9.5% ($p=0.01$). Znatno češće jednoplodni ART su primani u NICU sa prosečnim boravkom od 7.62 ± 7.05 dana u odnosu na spontane sa 4.61 ± 3.76 , ali bez kliničkog značaja. Nema značajne razlike kod jednoplodnih u učestalosti kongenitalnih malformacija, hromozomopatija, intrauterinog i perinatalnog mortaliteta.

Razlika, unutar ART jednoplodne kohorte ukazuje na primenu ICSI metode kod mlađih žena i to 45.3% od 35-39 godina, a IVF kod starijih od 40 godina sa 22.45% ($p=0.03$). Od komplikacija u trudnoći, kod ICSI metode se češće javlja gestacijski dijabetes sa 16.0% prema 8.8% kod IVF ($p=0.03$). Prosečno trajanje gestacije u ART populaciji, kao i način završavanja trudnoće, ne pokazuje razlike zavisno od vrste metode uz sličnu telesnu masu na rođenju, i dominacijom ženskog pola neonatusa. Ne neonatalni parametri ne pokazuju razliku zavisno od vrste metode odnosno Apgar skor, prijem NICU, prisutvo kongenitalnih malformacija, hromozomopatija, perinatalnom i neonatalnom mortalitetu.

Blizanačke trudnoće nastale metodama ART su kod prosečno mlađih žena sa 33.91 ± 3.91 godina, nego kod jednoplodnih, sa značajno manje trudnoća u anamnezi sa 17.5% prema 27.9% kod spontanih, bez razlike u paritetu, i sa primenom IVF metode sa 51.1% u odnosu na 48.9% ICSI. Od komplikacija trudnoće kod blizanačkih ART se češće dijagnostikuje gestacijski dijabetes sa 11.1% prema 6.8% ($p=0.01$) u odnosu na spontanu populaciju, dok su ostale komparabilne. Blizanačke ART trudnoće traju znatno kraće sa 35.87 ± 2.62 od spontanih sa 36.28 ± 2.62 ($p=0.008$). Blizanačke trudnoće nakon ART se obično završavaju carskim rezom u 85.5% prema 60.2% spontanih ($p=0.0001$). Prosečno su blizanci iz ART oko 30 grama lakši od spontanih blizanaca tj 2356.92 ± 572.27 prema 2391.99 ± 580.22 grama, ali bez značajnosti razlike. U blizanačkim trudnoćama i spontanim i nakon ART dominiraju dečaci. Spontani blizanci pokazuju bolju adaptaciju Ap skorom u 1 minuti sa 7.21 ± 2.16 prema 6.77 ± 2.09 , ali se razlika gubi sa Ap u 5 minuti. Art blizanci su češće boravili u NICU sa 19.07% prema 15.46% sa dužim boravkom sa 7.39 ± 8.25 dana. Kongenitalne malformacije su češće zabeležene u spontanoj populaciji 56 prema 38 u ART, kao i stope perinatalnog mortaliteta 4.55% prema 3.035% i neonatalnog mortaliteta.

Razlike međusobne između ART blizanaca u odnosu na vrstu metode nisu upečatljive i

očekivane. Žene kod kojih je primenjena ICSI metoda rezultovala blizanačkom trudnoćom su znatno mlađe sa 33.82 ± 3.91 prema IVF sa 35.58 ± 4.20 godina ($p=0.02$). Kao komplikacija u ART blizanačkim trudnoćama češće se javljaju hipertenzivni poremećaji u trudnoći, ako je postignuta ICSI 28.5% prema 20.5% sa IVF ($p=0.03$). Gestacije su sličnog trajanja kod ART blizanaca, nezavisno od vrste metode kod IVF 35.84 ± 2.55 nedelja i 35.90 ± 2.70 kod ICSI, a obe vrste trudnoća se najčešće završavaju carskim rezom i to 82.9% IVF i 88.0% ICSI. Blizanci nakon IVF su oko 10 grama teži nego nakon ICSI sa 2361.27 ± 571.29 grama prema 2352.40 ± 573.77 . Prosečna adaptacija sa Ap u 1 minuti se ne razlikuje zavisno od načina oplodnje sa 6.83 ± 2.05 kod IVF i 6.70 ± 2.14 kod ICSI blizanaca. Nema razlike u učestalosti prijema u NICU kod IVF 19.60% i ICSI 18.61%, ali sa dužim boravkom ICSI blizanaca sa 8.77 ± 9.12 dana. Sa podjednakom učestalošću se javljaju kongenitalne malformacije 3.33% kod IVF i 3.46% kod ICSI. Neonatalni mortalitet je nešto veći nakon ICSI sa 18.2‰ prema 16.0‰ IVF, kao i perinatalni mortalitet sa 38.3‰ nakon ICSI prema 29.8‰ kod IVF blizanaca.

Zaključci: Trudnoće postignute metodama IVF i ICSI se razlikuju po toku i ishodu odnosno stanju novorođenčeta od spontano začetih kod jednoplodnih trudnoća. Kod jednoplodnih trudnoća imamo veću učestalost gestacijskog dijabetesa i hipertenzivnih poremećaja u trudnoći. Jednoplodne trudnoće nakon ART traju kraće, odnosno se ranije završavaju i to carskim rezom od spontanih. Novorođenčad iz ART jednoplodnih trudnoća imaju nižu telesnu masu i sporiju postnatalnu adaptaciju po Apgar skor, ali sa podjednakom učestalošću kongenitalnih malformacija i hormozomopatija sa spontanom populacijom.

Blizanačke trudnoće nakon ART se razlikuju po učestalosti gestacijskog dijabetesa od spontanih, gestacije imaju kraće trajanje, zatim neonatusi imaju niže telesne mase i češći prijem u NICU, ali bez značajne razlike u ukupnom perinatalnom ishodu trudnoće, pa se ishod i tok ovih trudnoća ne razlikuje u odnosu na spontanu populaciju.

U slučaju jednoplodnih trudnoća nakon ART nema razlike međusobno u odnosu na vrstu primenjene metode, izuzev u većoj učestalosti gestacijskog dijabetesa nakon ICSI metode. Kod blizanačkih trudnoća primena različite vrste metode fertilizacije IVF ili ICSI ne dovodi razlike u toku i ishodu trudnoće i neonatusa.

KLJUČNE REČI: jednoplodne trudnoće, blizanci, IVF, ICSI, perinatalni ishod, neonatalni ishod.

PREGNANCY AND NEONATAL OUTCOME AFTER ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY

Jelena D. Stojnić

SUMMARY

Objective: With widespread use and more demand tendency for ART all over the world, there is growing concern regarding safety of the method. First, we want to determine whether in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) singleton and twin pregnancies are at increased risk for maternal pregnancy and fetal complications than spontaneous singleton and twin conceptions. Also, we want to investigate the neonatal outcome of singletons and twins after IVF/ICSI comparing with spontaneous neonatal population in the categories of congenital malformation, chromosomopathies, and admission to neonatal intensive care unit. Second, it is necessary to determine the possible negative effect on the ART singletons and twins according to the use of different method IVF or ICSI on perinatal outcome and occurrence of maternal and fetal complications. Also, our purpose is to determine the influence of the method of ART, IVF or ICSI on the neonatal outcome of ART children (singletons, twins) in the frequency of admission to NICU, congenital malformations, mortality rates.

Methods: The obstetrical outcome of 881 consecutive singleton and 560 consecutive twin pregnancies (1441) after IVF/ICSI, delivered at the Clinic for Gynaecology and obstetrics, Clinical Centre of Serbia, beyond 24th weeks of gestation, from the period 1st January, 2001 to 31st December 2011, were compared to 881 and 560 matched controls (spontaneously conceived singletons and twins), matching one to one by age, education, parity, time and place of delivery in the retrospective and prospective study.

Only pregnancies resulting from fresh IVF/ICSI and embryo transfer cycles were included in the study, and those with oocyte donations and cryopreserved embryos were excluded. Details on patients demographics, life style, and pregnancy outcome, and IVF procedure were collected from clinical protocols, patients charts and previous patients documentation.

All pregnancies were monitored according to clinical perinatal protocols by outpatient visits, hospitalisation stay, by ultrasonography, laboratory tests and regular exams.

Maternal complications pathology PIH, gestational diabetes mellitus, placenta previa, PPRM, placental abruption, need for cerclage application and invasive prenatal diagnosis were recorded. Data concerning fetal pathology as intrauterine fetal demise, presence of congenital malformations, intrauterine growth restriction, chromosopathy were encountered. Complications during labor, mode of delivery, gestational age, birth weight and Apgar scores, neonatal complications, admission to neonatal intensive care unit, and mortality rates were compared between the groups.

The statistical analysis was performed using IBM SSPS (statistical packages for social sciences) version 20.0 for Windows. The authors performed a univariable analysis, using Chi squared test and Fishers z test for categorical outcome variables and Student t test (parametrical data) and Mann Whithney U test (non-parametric data) for continuous outcome variables. A p value of <0.05 was considered significant.

Results: The average maternal age of singletons ART at the time of delivery is 35.70 ± 4.28 years, high grade education as 45.9%, and with no parity 94.8%. About 51.6% of ART procedures occupies IVF, and 48.4% ICSI. Pregnancy induced hypertension and gestational diabetes mellitus were more frequently presented at ART singleton pregnancies as 12.8% vs 9% for PIH ($p=0.01$), and GDM as 12.2% versus 8.6%, than at spontaneously conceived singletons, as is PPRM from 32-37 wg ($p=0.02$).

The mean gestational age at delivery for ART singletons was 5 days shorter with 38.14 ± 1.82 days than at spontaneously conceived singletons 38.65 ± 1.72 days, with significantly higher preterm delivery from 32-37 weeks gestation as 7.8% at ART singletons ($p=0.01$). Almost 83.3% of ART singleton pregnancies were delivered by caesarean section, while 66.1% spontaneously conceived singletons ended up in vaginal delivery mode ($p=0.001$), with seemingly different management according to the origin of pregnancy.

ART singletons average birth weight is 100 grams lower than spontaneous, with 3198.37 ± 596.11 vs 3350.00 ± 560.00 g, ($p=0.0001$). Risk to be born with birth weight less than 2500 grams is significantly higher if you are ART singleton ($p=0.01$). The greater proportion of ART singletons 14.1% was graded with Apgar score less than 7 in the first minute than spontaneous 9.5% ($p=0.01$), which is the most prominent in the category of Apgar from 4-7. Admission to NICU is more often recorded at ART

singletons with average stay 7.62 ± 7.05 days versus 4.61 ± 3.76 at spontaneous singletons, but with no overall clinical significance. Comparable results were recorded between ART and spontaneous singletons regarding frequency of congenital malformations, chromosomopathies, perinatal and neonatal mortality rates.

Between ART singletons, the maternal age is lower when ICSI was performed with 45.3% aged from 35-39 years, and about 22.45% of women older than 40 years was performed with classical IVF ($p=0.03$). Gestational diabetes mellitus is more recorded with ICSI singletons 16.0% than when IVF is employed 8.8% ($p=0.03$), with comparable other pregnancy complications in ART singletons. Regardless of ART method, there is no significant difference in the average gestational age at delivery, mode of delivery, average birth weight, Apgar score, and female dominance between ART singletons. The method of ART has no influence on the rates of intrauterine fetal demise, perinatal and neonatal mortality, admission to NICU, and also chromosomopathies and congenital malformations at ART singletons.

Women with successful ART twin pregnancies are younger than ART singletons with 33.91 ± 3.91 years, with less pregnancy per anamnesis 17.5% than 27.9% at spontaneous twins, and with 51.1% with IVF as fertilization mode against 48.9% with ICSI mode. Gestational diabetes mellitus is most present complication in ART twins with 11.1% compared to 6.8% at spontaneous twins ($p=0.01$), while others are comparable. The average duration of ART twins pregnancy is 35.87 ± 2.62 weeks, less than spontaneous twins 36.28 ± 2.62 ($p=0.008$). The higher proportion of ART twins pregnancies 85.4% is ended up through caesarean section than spontaneous twins 60.2% ($p=0.0001$). Average twin ART birth weight is 30 grams lower than spontaneous twins 2356.92 ± 572.27 vs 2391.99 ± 580.22 , which is not significant. There is dominance in both groups by male gender. Spontaneous twins have better average Apgar scores at 1 minute 7.21 ± 2.16 versus ART twins 6.77 ± 2.09 , but the difference disappears after 5 minutes score. ART twins are more often admitted to NICU with 19.07% versus 15.46% at spontaneous twins, with longer stay duration 7.39 ± 8.25 days. Surprisingly, congenital malformations are more often enlisted at spontaneous twins 56 versus 38 at ART twins, as perinatal mortality rates 4.55% versus 3.035%, and neonatal mortality rates 21.95/1000 live births versus 13.60/1000 live births ART.

Differences between ART twins according to the fertilization mode IVF or ICSI are not

remarkable. Women with ART twins and ICSI fertilization mode are younger with 33.82 ± 3.91 years regarding those with IVF with 35.58 ± 4.20 ($p=0.02$). When ICSI method is employed, there is higher frequency of hypertensive gestational disorders 28.5% at ART twins versus 20.5% at IVF twins ($p=0.03$). At twins, regardless of fertilization method, the average gestational length is similar 35.84 ± 2.55 at IVF and 35.90 ± 2.70 for ICSI twins. In both cases, the caesarean section is favourable mode of delivery 82.9% at IVF and 88.0% at ICSI twins. ART twins obtained with IVF are 10 grams heavier than ICSI twins, with average birth weight for IVF 2361.27 ± 571.29 grams versus ICSI 2352.40 ± 537.77 grams. Similar average Apgar score at 1 minute were recorded at IVF twins 6.83 ± 2.05 and ICSI twins 6.70 ± 2.14 . No significant differences in the appearance of congenital malformations for IVF 3.33% and ICSI twins 3.46%. Neonatal and perinatal mortality rates are slightly higher at ICSI twins 18.2‰ versus 16.0‰ at IVF, and 38.3‰ after ICSI and 29.8‰ at IVF twins.

Conclusion: Assisted reproductive singleton pregnancies have different pregnancy and neonatal outcome compared with spontaneously conceived pregnancies. At ART singletons are likely that pregnancy will be complicated with hypertensive disorder and gestational diabetes mellitus more often than in spontaneous gestations. ART singleton pregnancies have average shorter length of gestational period with often earlier delivery, and with caesarean section as dominant delivery mode. ART singletons have lesser average birth weight and slower adaptation enlisted with Apgar score at 1 minute than spontaneous singletons, but with similar appearance of congenital malformations and chromosopathies.

Assisted reproductive twin pregnancies have not different pregnancy and neonatal outcome compared with spontaneously conceived twin pregnancies. Gestational diabetes mellitus is more likely to complicate ART twin pregnancy, average gestational duration is lower, neonates have average less birth weight and more often NICU admission, but without significant implication on general result.

The mode of fertilization at ART singletons is connected with more frequent appearance of gestational diabetes mellitus at ICSI, but with no general difference in pregnancy and neonatal outcome of ART singletons. The mode of fertilization has no impact on pregnancy and neonatal outcome for ART twins.

KEY WORDS: singletons, twins, IVF, ICSI, pregnancy outcome, neonatal outcome

Sadržaj

UVOD.....	1
INFERTILITET I ART.....	4
Ženski faktor.....	5
Muški faktor.....	6
Nepoznati faktor infertiliteta.....	8
Kombinovani faktor infertiliteta.....	9
PROŠIRENE INDIKACIJE ZA PRIMENU.....	9
KONTROLISANA OVARIJALNA STIMULACIJA.....	10
Naturalni ciklus.....	10
Klomifen citrat.....	11
Sekvencijalna terapija klomifen-citratom i egzogenim gonadotropinima.....	11
Egzogena stimulacija gonadotropinima nakon upotrebe GnRH agonista – dugi protokol.....	12
Terapija sa GnRh antagonistima i egzogenim gonadotropinima.....	17
PUNKCIJA FOLIKULA I ASPIRACIJA OOCITA.....	19
TEHNIKE FERTILIZACIJE IN VITRO.....	22
Priprema oocita za ICSI.....	25
Priprema spermatozoida za ICSI.....	26
Dobijanje i selekcija spermatozoida za ICSI metodu.....	26
Pravilno postavljanje oocita za postupak.....	31
Ruptura ooleme prilikom ubacivanja spermatozoida.....	31
EMBRIOKULTURA.....	32
Proširena kultura blastociste.....	32
PREIMPLANTACIONA GENETSKA DIJAGNOSTIKA I SKRINING.....	34
NEINVAZIVNI PREIMPLANTACIONI GENETSKI SKRINING.....	38
EMBRIOTRANSFER.....	41
Receptivnost endometrijuma.....	43

Broj embriona za embriotransfer.....	45
KRIOPREZERVACIJA.....	47
Krioprezervacija embriona.....	48
Krioprezervacija sperme i tkiva testisa.....	50
NEŽELJENI EFEKTI ART.....	51
Višeploidne trudnoće i ART.....	51
Jednoplodne trudnoće i ART.....	52
Kongenitalne malformacije i ART.....	54
Poremaćaji genskog imprintinga.....	55
CILJEVI RADA.....	58
HIPOTEZE.....	60
KLINIČKI MATERIJAL I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA.....	62
Prikupljanje podataka.....	63
Statistička analiza.....	66
REZULTATI.....	68
DISKUSIJA.....	109
ZAKLJUČCI.....	142
LITERATURA.....	145

UVOD

Poslednjih dvadeset pet godina su donele neverovatne obrte i saznanja u području razumevanja fiziologije, patologije i genetike humane reprodukcije. Upravo ovaj napredak, uslovio je pored uvođenja niza novih metoda u terapiji infertiliteta, ali i otvaranje novih dilema o bezbednosti procedure.

ART (assisted reproductive technologies eng; asistirane reproduktivne tehnologije) podrazumeva sve tehnike koje obuhvataju direktnu manipulaciju sa oocitima van ženskog tela. Najrasprostranjenija i najviše korišćena metoda ART je IVF (in vitro fertilizacija), ali postoje i značajan broj srodnih tehnika koje spadaju u ovu grupu.

Zahvaljujući sve većoj liberalnosti i rasprostranjenosti metoda asistirane fertilizacije, u svetu je rođeno više od 5000000 dece (ESHRE, 2012; Higgins, 2013). Počevši od prve bebe iz epruvete Louise Brown, koja je i sama postala majka 2008.godine, a rezultat je in vitro fertilizacije u Engleskoj, 1978. iz spontanog ciklusa, sve do danas traju debate, da li su deca iz ovako začetih trudnoća, ista kao i ona spontano začeta (Steptoe, Edwards, 1978). Interesantno je da je prva zabeležena trudnoća 1976. godina kao rezultat in vitro fertilizacije sa laparoskopskom aspiracijom oocita bila ektopična. (Steptoe, Edwards, 1976).

Prva beba iz IVF (in vitro fertilizacija) u Srbiji je rođena 1987. godine na Klinici za ginekologiju i akušerstvo u Beogradu. U većini zemalja IVF deca predstavljaju 2 do 4 % ukupno rođene dece godišnje (Brison i sar., 2013).

Danas, postupak IVF uključuje više etapa počevši od kontrolisane ovarijalne stimulacije (KOH) sa egzogenim gonadotropinima, transvaginalnu punkciju folikula pod ultrasonografskom kontrolom, laboratorijsku in vitro fertilizaciju, kao i transcervikalni embriotransfer u matericu pod kontrolom ultrazvuka.

Od početka primene metode vantelesne oplodnje načini dobijanja oocita su uključivali upotrebu spontanog ciklusa, došlo je do primene različitih režima stimulacije ovulacije odnosno minimalne stimulacije (klomifen citrat), blage stimulacije (sekvencijalna terapija klomifen citrat-egzogeni gonadotropini) do agresivne stimulacije visokim dozama gonadotropina u kombinaciji sa GnRh agonistom ili antagonistom (COH kontrolisana ovarijalna hiperstimulacija).

Uvođenjem u terapiju infertiliteta dugodelujućih Gn Rh agonista od 1989. godine

napravio je radikalni potez u pristupu ovarijalne stimulacije u ART obezbeđujući način za nishodnu regulaciju endogene hipofizne sekrecije gonadotropina i na taj način prevenciju prevremenog endogenog skoka LH za vreme stimulacije egzogenim gonadotropinima (Meldrum, 1989; Edwards i sar., 1996). Takozvani dugi protokol stimulacije ovulacije je postao najčešće korišćeni režim ovarijalne stimulacije u IVF i najuspešniji do sada (Hughes i sar., 1992; Daya, 2000.). Devedesetih godina u kliničku praksu su uvedeni GnRh antagonista u stimulative režime sa ciljem sprečavanja prevremenog skoka LH i pokušaja prevazilaženja nekih od neželjenih efekata upotrebe GnRh agonista (European and Middle East Orgalutran Study group, 2001; Fluker i sar., 2001; Albano i sar., 1997; Olivennes i sar., 2003).

Sama tehnika ART je pretrpela mnogobrojne promene i usavršavanja po svim etapama uključujući primenu transvaginalne punkcije oocita pod kontrolom ultrazvuka (UZ) u upotrebi od 1985 (Wickland i sar.), zatim primenu transcervikalnog embriotransfera uz ultrasonografski nadzor od 1985. (Strickler i sar.), umesto laparoskopskih transfera, kao i način kontrolisane ovarijalne stimulacije, i laboratorijskih tehnika in vitro fertilizacije.

Danas ART uključuje i primenu ICSI (intracytoplasmic sperm injection) od 1992. Palermo i sar., , koristeći spermiju dobijenu iz ejakulata ili dobijenu mikrohiruškom aspiracijom iz epididimisa (MESA) ili testikularnom sperm ekstrakcijom (TESE) Devroey i sar., 1994, asistirani embrionalni hatching kao i preimplantacionu genetsku dijagnostiku (PGD). PGD (preimplantation genetic diagnosis) je prvi put uspešno primenjena 1990. godine za selekciju ženskog embriona kod para sa rizikom za prenos X vezane bolesti (Handsyde i sar. 1990.).

U većini slučajeva, IVF koristi sopstvene ćelije u proceduri, i pomaže parovima da dobiju biološkog potomka, ali i donacije sperme, oocita, embriona, kao i surogat roditeljstvo su opcije u upotrebi, zavisno od uslova i okolnosti slučaja.

Primenom postupaka krioprezervacije gameta i embriona, kao rutinsku u postupke IVF, omogućile su spašavanje mnogih svežih ciklusa, izbegavanje multiple ovarijalne stimulacije, odlaganje reprodukcije, kao i redukovanje stopa multiplih trudnoća. Trounson i sar., su 1983. objavili prvo uspešno živorođenje nakon odmrzavanja embriona i transfera.

Kako je dolazilo do sve većeg napretka i uvođenja novih procedura, tako je raslo interesovanje za bezbednost postupka. I pored primene metoda asistirane fertilizacije

vise od 30 godine, velikog broja rođene dece, stalnog usavršavanja tehnologije rada i nesumljivog doprinosa humanoj reprodukciji, ostaju brojne dileme i pitanja. Najvažnija su vezana za moguće kongenitalne (epigenetske) promene kod potomaka i njihov značaj.

Najveći neželjeni efekat postupka predstavljaju višeploidne trudnoće (Pinborg i sar., 2004.). Povećan perinatalni mortalitet i često dugotrajni morbiditet, komplikacije majke i visoki medicinski troškovi su prevelika cena koju plaćaju pojedinci, društvo i medicinska profesija.

Registri evropskih i američkih udruženja za reproduktivni medicinu, prema podacima iz 2004., godine ukazuju na visoku stopu multiplih trudnoća od 26,4% i 35,4% u odnosu na 1.2% blizanačkih trudnoća iz spontane koncepcije (Nyboe-Andersen i sar., 2004). Znači, skoro polovina IVF dece pripada "setu" multiplih beba".

Različita politika broja embriona prilikom transfera dovodi varijirajućih frekvencija multiplih porođaja od 38.3% u Srbiji do 5.7% u Švedskoj. (Pinborg i sar., 2013).

U početku, lošiji perinatalni ishod je pripisivan multiplim trudnoćama i njihovom procentualnom učešću u ukupnom broju dece sa prematuritetom i njegovim posledicama u vidu povećanog mortaliteta i dugotrajnog morbiditeta. Međutim, ubrzo su se pojavili i izveštaji o lošijem perinatalnom ishodu jednoplodnih trudnoća iz ART u vidu povećanog rizika za pretermijski porođaj, prematuriteta, usporenog rasta i povećane učestalosti kongenitalnih malformacija, perinatalnog mortaliteta i cerebralne paralize. (Helmerhorst i sar., 2004; Mc Donald i sar., 2009; Sazonova i sar., 2011; Pandey i sar., 2012).

Pitanje kongenitalnih malformacija kod dece iz ART je još uvek konfliktno. Ima izveštaja koji govore o sličnoj stopi kongenitalnih malformacija kao i opštoj populaciji (Kallen i sar., 2010; Daubeney i sar., 2012; Zhu i sar., 2006), do neki izveštaji navode veći rizik pojave kongenitalnih malformacija (Bonduelle i sar. 2005; Ericson, Kallen, 2001; Hansen i sar., 2002); Olivennes, 2005; Zwink i sar., 2012). Posebna pažnja je upravljena na vezi ICSI metode sa rizikom pojavom kongenitalnih malformacija, gde su rezultati kontradiktorni. Naime, neki izveštaji ukazuju na vezu ICSI metode i većeg rizika pojave kongenitalnih malformacija (Bonduelle i sar., 1998; Hansen i sar., 2002; Belva i sar., 2008), dok neki ne nalaze povećan rizik (Wennerholm i sar., 2000, Wang i sar., 2005). Jedino stanje kod ART dece koje se jasno može povezati sa primenom ICSI metode je hipospadija kod muških potomaka (Wennerholm i sar., 2000). Međutim, kao

je stanje povezano sa muškim infertilitetom, koji zahteva ICSI proceduru, veza je praktično nametnuta.

Mogućnost nastanka genomskih imprinting poremećaja kod ART dece zbog remećenja mehanizama uspostavljanja i održavanja imprintinga tokom gametogene, in vitro fertilizacije i embriogeneze, je činjenica koja izaziva veliku zabrinutost. Počevši od 2002. citave serije izveštaja su ukazale na povećan rizik pojave bolesti imprintinga (Beckwith-Wiedemann, Angelman sindrom) kod ART dece (Bowdin i sar., 2007; Chason i sar., 2011). Zatim, i za druge bolesti imprintinga su počeli da se pojavljuju izveštaji kao što su Siler-Russel sindrom, Maternalni hipometilacijski sindrom, retinoblastom (Owen, Segars, 2009). Niska stopa učestalosti ovih sindroma i u opštoj populaciji, dodatno otežava sagledanje veze bolesti imprintinga i ART (Nelissen i sar., 2013).

Naime, posebnu zabrinutost za bezbednost celog postupka i uticaja na zdravlje dece iz ART se pripisuje etapama hormonske stimulacije, metodom ICSI intracitoplazmatske injekcije spermatozoida, uslovima i sastavu in vitro embriokulture u kojoj se nalaze preimplantacioni embrioni pre transfera u matericu i postupku kriprezervacije, kao i postupcima preimplantacione genetske dijagnostike (Zegers-Hochschild, 2009). Za svaku od ovih procedura su sprovedena obimna istraživanja i probano da se pokaže potencijal da promene razvoj i strukturu normalnih gameta i embriona, kao i taj uticaj na zdravlje ART potomaka.

INFERTILITET I ART

U početku metoda in vitro fertilizacije je razvijena kao tehnika za terapiju tubarnog infertiliteta, koji se nije mogao operativno korigovati, danas je široko rasprostranjena i obuhvata skoro sve uzroke infertilieta.

Infertilitet se definiše kao period od jedne godine regularnih nezaštićenih odnosa u ovulatornoj fazi ciklusa uz uredne menstruacione cikluse bez koncepcije. Uopšteno, 85-90% parova u reproduktivnoj dobi će ostvariti trudnoću u toku godinu dana. Fekundibilitet po ciklusu je verovatnoća da će pojedinačni ciklus dovesti do trudnoće i iznosi 20-25%, a fekunditet verovatnoća da će pojedinačni ciklus rezultovati živorođenjem.

Smatra se da se 10-15% parova u reproduktivnoj populaciji suočava sa infertilitetom.

Stopa infertiliteta je stabilna poslednjih 30 godine, ali je mnogo poboljšana dijagnostika i terapija infertiliteta, kao i zahtevi populacije za potomstvom, što odaje utisak povećavanja stope. Na povećanu stopu poseta klinikama za terapiju infertiliteta utiču i odlaganje reprodukcije za poznije godine, način života sa udelom pušenja, gojaznosti, stresa, bolja informisanost i dostupnost informacija, kao i poboljšani rezultati terapije i primena novih metoda. Zbog socijalnih promena u društvu sa većim procentom zaposlenih žena i odlaganjem reprodukcije uz napomenu da su godine žene ključni faktor u infertilitetu.

Ženski faktor

Na ženski faktor otpada oko 30%, muški 30%, kombinovani oko 30% i 10% nepoznati uzroci infertiliteta.

U strukturi ženskog infertiliteta sa 50% je ovarijalni faktor, 35% tubo-peritonealni, 15% uterini, 5% cervikalni i 5% imunološki.

Ovarijalni faktor obuhvataju problemi uzrokovani efektima starenja i smanjenje ovarijale rezerve, stanja hronične anovulacije (PCOS), centralne i hipotalamusno-hipofizne amenoreje (anovulacije) i ovarijalne cistične formacije (endometrioza).

Tubarni faktor je sekundarni najčešći urok infertiliteta sa spektrom uzroka od endometrioze, infekcija, prethodnom sterilizacijom, ranijim operacijama u abdomenu i karlici, kao i funkcionalna neadekvatna funkcija tuba u vidu poremećaja motiliteta i cilijarnog aparata.

Uterini faktor obuhvata kongenitalne malformacije (poremećaji formiranja i fuzije Milerovih cevi), prisustvo mioma, kao i polipi, adhezije, kao i probleme sa receptivnosti endometrijuma.

Cervikalni faktor: cerviks je mesto prolaza spermatozoida i svaki problem sa ulaskom u cervikalni kanal u odgovarajućem momentu, kao i prolaz, može uticati na kvalitet sperme. Anatomske poremećaji kongenitalni (uzak cervikalni kanal) ili jatrogeni (konizacija), kao i infekcije ili imunološki faktor, mogu remetiti cervikalnu fazu.

Imunološki faktor obuhvata imunološku reakciju i proizvodnju antitela na epitopove prisutne u serumu, semenju tečnosti i spermatozoidima muškarca, kao i one kod žena prisutne u serumu, vaginalnoj sekreciji i folikularnoj tečnosti žena. Smatra se da obuhvata do 5 % od ženskog infertiliteta, mada se antispermatozoidna antitela

produkuju i kod muškaraca. Izotipovi antitela obuhvataju klase IgA, IgM i IgG i mesto produkcije je cervikalne epitel, a detektujemo ih u serumu, vaginalnoj i cervikalnoj sluzi i folikularnoj tečnosti.

Zavisno od serotipa i lokalizacije antitela smatra se da je nivo njihove interferencije sa humanom reprodukcijom sledeći:

- otežavaju ili onemogućavaju penetraciju spermatozoida kroz cervikalni mukus (vezivanjem za repove spermatozoida imobilisu ih)
- ako su antitela vezana u predelu glave spermatozoida ili su prisutna u folikularnoj tečnosti interferiraju sa fertilizacijom
- pretpostavljeni noviji mehanizam delovanja je da dovode do lošeg razvoja embriona (deobe) ili remete implantaciju embriona u postupcima asistirane fertilizacije.

Uloga prisustva antispermatozoidnih antitela u semenu muškarca još uvek je predmet debate. Naime, smatra se da prisustvo određenih frakcija antispermatozoidnih antitela dovodi do remećenja motiliteta i na taj način remeti fertilizaciju spontanu, kao i neke metode asistirane fertilizacije, pa se metoda mikromanipulacije savetuje kod navedenih slučajeva.

Barijera krv-testis onemogućava imunološko prepoznavanje i reakciju imunog sistema na spermatozoide. U slučaju narušavanja barijere i izlaganja epitopova sperme imunom sistemu, dolazi do prepoznavanja i aktivacije sa odgovorom imunog sistema u vidu produkcije antitela. Rizik od narušavanja barijere krv-testis je povećan kod genitalnih infekcija, duktalnih obstrukcija, traume ili torzije testisa ili reverznih sterilizacija (Turek, 1999). nema kliničkih dokaza o štetnoj ulozi antitela u serumu (Collins i sar., 1993), za razliku od onih prisutnih u semennoj tečnosti (Mahony i sar., 1991).

Prisustvo antiovarijalnih antitela kao imunološkog uzroka prevremene ovarijalne insuficijencije, još uvek nije rutinska metoda ispitivanja.

Muški faktor

Muški faktor infertiliteta obuhvata kao samostalan oko 1/3 slučajeva infertiliteta, a u sklopu kombinovanog još 20-40% slučajeva. Prema preporuci SZO pod optimalnim nalazom spermograma se podrazumeva:

- volumen: 1.5-5.0 ml

- pH > 7.2,
- viskozitet <3 (0-4)
- koncentracija >20 miliona/ml.
- Ukupan broj >40 miliona/ejakulat
- procenat motiliteta >50%
- progresivno pokretni > 32%
- normalna morfologija >4%
- vitalnost > 58%

U prošlosti, sve oči su bile uperene u ženski infertilitet, a muški je često smatran nevažnim i zanemarivan. Uzroci muškog infertiliteta su različiti i mogu se podeliti u tri grupe

1. poremećaji produkcije sperme
2. poremećaji funkcije sperme
3. obstrukcije duktalnog sistema

1. Poremećaji produkcije sperme

Mogu nastati kao posledica primarne insuficijencija testisa nastale kao rezultat genetskih abnormalnosti (Klinefelterov sindrom, delecije Y hromozoma), direktnim oštećenjem testisa (kriptorhizam, varikokela), posledica infekcije (Mumps orhitis), ili delovanjem gonadotoksina (povišena temperatura, pušenje, teški metali, zračenje, organski rastvarači, pesticidi, kao i lekovi anabolički steroidi, cimetidin, spiroloolakton, eritromicin, sulfasalazin, hemioterapeutici).

Do poremećaja funkcije testisa dovode i neadekvatna produkcija gonadotropina uzrokovana genetskim defektima (izolovani deficit gonadotropina), direktni ili indirektni efekti tumora hipofize ili hipotalamusa ili unošenja egzogenih androgena (sa supresijom ili inhibicijom sekrecije gonadotropina).

2. Poremećaji funkcije sperme

Funkcionalni poremećaji sperme nastaju kod prisustva antispermatozoidnih antitela, inflamacija u genitalnom traktu (prostatitis), varikokele, biohemijskih poremećaja (poremećaji oksidativnog metabolizma ili prisutni slobodni radikali), poremećaji ili izostanak akrozomske reakcije i problemi sa adherencijom na zonu pelucidu i vezivanje ili problem penetracije.

3. Obstrukcije duktalnog sistema

Mogu biti kongenitalni ili stečeni i obuhvataju od kongenitalnog bilateralne agenezije duktusa deferensa, obstrukcije ili nedostatka epididimisa i ejakulatornih kanala, kao i posledice prethodnih vazektomija.

Otežavajuća okolnost kod muškog faktora infertiliteta je idiopatski uzrok, što zapravo govori o našem nedovoljnom razumevanju funkcionisanja testisa i njegove regulacije.

Tretman muškog infertiliteta je doživeo revoluciju uvođenjem klasične metode in vitro oplodjenja i ICSI metode. Za klasičnu metodu in vitro fertilizacije (IVF) danas je dovoljno 50.000-100.000 pokretnih spermatozoida posle obrade za inseminaciju po oocitu, što pokriva srednje teške slučajeve muškog infertiliteta. Ali kod teških formi poremećaja spermatogeneze, uvođenjem ICSI metode je došlo do rezultata (Palermo i sar, 1992).

Nepoznati faktor infertiliteta

Neobjašnjen odnos nepoznat uzrok infertiliteta je dijagnoza pri čemu su svi ispitivani parametri u okviru normalnih rezultata (uredan spermogram, objektivni dokazi ovulacija, bilateralno kompetentne tube uterine, normalan kavum, odsustvo antispermatozoidnih antitela, regularni odnosi). Učestalost neobjašnjenog infertiliteta u populaciji je oko 10%, a raste učestalost do 30% u infertilnoj populaciji, zavisno od dijagnostičkih kriterijuma (Crosignani i sar., 1993).

Najverovatnije uzroci neobjašnjenog infertiliteta se nalaze u abnormalnostima funkcije oocita ili spermatozoida, poremećajima fertilizacije, implantacija ili ranog preembrionalnog razvoja, čiju detekciju nije moguće izvršiti standardnim metodama evaluacije infertiliteta. Neki autori smatraju abnormalnu funkciju tuba, koju nije moguće detektovati metodama koje uglavnom procenjuju anatomske integritet tuba (HSG, laparoskopija), uzrokom nepoznatog infertiliteta i da neuspeh protokola sa IUI, a kasniji uspeh IVF govori u prilog tome. Sa uvođenjem asistirane fertilizacije primećene su slučajevi izostanka fertilizacije standardnom metodom IVF, zatim patološke deobe embriona i zastoji u deobi koji se ponavljaju u više ciklusa, kao i rani preembrionalni gubici ploda uz poremećaje implantacije.

Kod parova sa neobjašnjem infertilitetom terapija je empirijska, i ART je terapija izbora za neke, a zadnja opcija za ostale. Stope uspeha u US registru za IVF za 2000-u godinu

stopa živorođenih po ciklusu po paru sa neobjašnjenim infertiliteom je iznosila 28% (CDC, 2003.). Kod parova kod kojih su druge metode tretmana nepoznatog infertiliteta bile neuspešne, u ART je registrovana veća učestalost neuspeha fertilizacija i niže stope trudnoća u odnosu na druge indikacije, što govori u prilogu neobjašnjivom infertilitetu kao posledica abnormalnosti fertilizacije, ranog razvoja embriona ili neadekvatnoj implantaciji (Takeushi i sar., 2000; Gurgan i sar, 1995).

Kombinovani faktor infertiliteta

Označava istovremeno prisutvo faktora od strane obe partnera. Obično su udruženi tubarni ili ovarijalni faktor sa muškim u vidu poremećaja spermatogeneze. Metode asistirane fertilizacije su često najoptimalniji tretman jer mogu istovremeno uspešno prevazići više problema.

PROŠIRENE INDIKACIJE ZA PRIMENU

IVF predstavlja i takozvanu zadnju stepenicu u terapiji infertiliteta, rezervisanu za one parove, kod kojih sve prethodne primenjene metode nisu pokazale rezultat.

Kod žena sa prematurnom ovarijalnom insuficijencijom, kao i onih u poznom reproduktivnom dobu, IVF sa primenom donorskih oocita od mladih donorki je veoma uspešna metoda. Pacijetkinje sa normalno prisutnim ovarijumima, ali bez funkcionalnog uterusa (agenezija ili poremećaji spajanja Milerovih kanala, sindromi intrauterinih adhezija, ranija histerektomija) ili žene sa ozbiljnim sistemskim bolestima gde bi trudnoća ugrozila zdravlje majke, IVF sa embriotransferom u surogat gestacijsku majku je metoda izbora za dobijanje genetskog potomka.

Kod parova koji su dokazani nosioci autozomno-recesivnih ili bolesti vezanih za X hromozom ili balansiranih hromozomskih translokacija, metoda izbora je IVF sa primenom PGD (preimplantation genetic diagnosis) i embriotransfer neaficiranih embriona. Ove metode se sve više primenjuju i u slučajevima isključivanja aneuploidija embriona kod žena u odmaklim reproduktivnim godinama, kao i kod onih sa ponovljnim neuspešnim IVF postupcima uprkos naizgled idealnim embrionima za tranfer.

KONTROLISANA OVARIJALNA STIMULACIJA

Idealan stimulacioni protokol, za IVF bi trebalo da ima mali procenat otkazanih ciklusa (odustajanja), minimalizuje troškove za lekove, rizike i neželjene efekte terapije, smanji potrebu intenzivnog monitoringa, bude komforan za aplikaciju i kao rezultat stimulacije rezultuje jednoplodnom trudnoćom. Ovakav protokol stimulacije ovulacije još uvek nije definisan. Svaki od kasnije opisanih režima stimulacije ima svoje prednosti, nedostatke i primenu. Režim stimulacije treba individualizovati, odnosno prilagoditi pojedinačnom pacijentu i treba ga odrediti na osnovu godina starosti, ovarijalne rezerve, indeksa telesne mase, kao i odgovoru na prethodni proces stimulacije.

Naturalni ciklus

Prva uspešna trudnoća iz IVF je rezultat spontanog nestimulisanog ciklusa (Stephoe, Edwards, 1976). Spontani ciklus za IVF je još uvek u upotrebi ali stopa otkazivanja je visoka (25-75%), kao i uspešnost (10-14%) u odnosu na primenu ciklusa sa stimulacijom ovulacije. U spontanom ciklusu uvek imamo samo jednu ćeliju i jedan embrion, nema mogućnosti zamrzavanja viška embriona i niska stopa uspeha se prepisuje niskoj implantaciji jednog embriona.

Danas je spontani IVF ciklus opcija za poor respondere, žene odmakle reproduktivne dobi, one sa medicinskim gde je primena stimulacije ovulacije kontraindikovana ili onih koji na lični zahtev ne žele lekove za stimulaciju ovulacije. Modifikovani naturalni ciklus uz upotrebu Gn Rh antagonista radi sprečavanja prevremenom skoka LH je popravio stope uspešnosti naturalnog IVF ciklusa (Ng i sar., 2001, Leroy i sar., 1994, Frydman, 2004). Rongieres-Bertrand i sar., su 1999. godine predložili dodatak GnRh antagonista kada vrednosti plazma estradiola dostignu 100-150pg/ml i vodeći folikul promer 14mm.

U naturalnom ciklusu uobičajena je praksa dodavanja egzogenog humanog horionskog gonadotropina (hCG) koji redukuje potrebu za učestalim monitoringom serumskog LH u cilju detekcije skoka. Problem spontanog ciklusa je punkcija samo jednog folikula i mogućnost nedobijanja jajne ćelije kao i studiji u osam ciklusa IVF kod 22% nisu dobijeni oociti urpkos multiplim ispiranjima (Rongieres- Bertrand i sar., 1999), dok neke studije prijavljuju oko 10% praznih folikula (Lenton, Woodward, 1993).

IVF protokoli iz modifikovanih spontanog ciklusa uz embriotransfer su praktični, bez sporednih neželjenih efekata i izuzetno prihvatljivi za pacijetkinje gde nije u pitanju ženski faktor steriliteta. Stopa otkazivanja je mala (9.0%) u poređenju sa ranijim izveštajima, uz prijavljenu stopu trudnoća po aspiraciji 17.5%, a ako je bilo embriotransfera stopa trudnoća je 32%.

Lekovi za indukciju ovulacije uzrokuju multifolikularni razvoj, na taj način povećavajući broj dobijenih oocita, samim tim povećavaju verovatnoću fertilizacije, dostupnost većeg broja embriona za selekciju i embriotransfer, kao i verovatnoću uspeha odnosno postizanje trudnoće.

Protokoli kontrolisane ovarijalne stimulacije (KOS) obuhvataju:

Klomifen citrat

Minimalna stimulacija ovulacije klomifen citratom obično dovodi do stvaranja dva ili više folikula kod većine žena sa regularnim ovulatornim ciklusima. Ovim protokolom se dobija znatno manje ćelija (1-3) nego sa primenom egzogenih gonadotropina, a malo više nego u spontanom ciklusu. Stopa otkazivanja ciklusa je nešto niža nego u spontanom, sa većim brojem dobijenih oocita, transferisanih embriona i stope trudnoća. (Ingerslev i sar., 2001; Branigan, Estes, 2000). Kao i kod spontanog ciklusa, egzogeni hCG se aplikuje po dostizanju veličine folikula, kao i često se u ovim protokolima aplikuje i GnRh antagonist radi sprečavanja LH prevremenog skoka.

Mnoge kliničke randomizovane studije su pokazale poredeći rezultate spontanog IVF ciklusa i IVF ciklusa stimulisano klomifen citratom, da nema negativnih efekata stimulacije na rast i razvoj endometrijuma (Ingerslev i sar., 2001, Branigan, Estes, 2000). Niski troškovi stimulacije, manja potreba monitoringa ultrasonografskog i hormonskog, ubrajaju ovaj protokol u „friendly“ IVF protokole sa sve većom primenom poslednjih godina.

Sekvencijalna terapija klomifen-citratom i egzogenim gonadotropinima

Sekvencijalna terapija klomifen-citratom i niskom dozama egzogenih gonadotropina je efikasnija i stimulisanjem dovodi do pojave multifolikularnog razvoja većeg nego terapija samim klomifenom. Cena postupka je viša, kao i potreba za monitoringom ciklusa, ali mnogo niža u odnosu na protokole sa primenom GnRh antagonistima i egzogeni

gonadotropini. Stopa trudnoća u fresh svežim embriotransferima nije značajno manja u odnosu na standardni protokol GnRH analog i egzogeni gonadotropini, ali je manji procenat razvoja ovarijalnog hiperstimulacionog sindroma. Često se u ovim protokolima dodaje i GnRh antagonist radi prevencije inače retkog prevremenog skoka LH i posledične ruptуре folikula (Williams i sar., 2002).

Egzogena stimulacija gonadotropinima nakon upotrebe GnRH agonista – dugi protokol

Uvođenje GnRH agonista u protokole stimulacije ovulacije u okviru postupka vantelesne oplodnje je temeljno promenilo pristup stimulaciji ovulacije i dovelo do značajnog poboljšanja uspeha same metode odnosno povećanje postizanja broja trudnoća.

Primena GnRh agonista down regulacijom sopstvenih receptora dovodi do smanjenja lučenja sopstvenih gonadotropina i na taj način sprečava prevremeni endogeni skok LH u toku stimulacije. Na ovaj način rizik prevremene ruptуре folikula ili luteinizacije, zbog koga jer stopa napuštanja ciklusa bila oko 20%, je smanjena na minimum (2%), pa se stimulacija može nastaviti do maturacije folikula. Stimulacija ovulacije primenom GnRh agonista uz egzogene gonadotropine dovodi do dobijanja većeg broja oocita i veće stope trudnoća nego samo primenom egzogenih gonadotropina (Daya, 2000). Da bi se postigla adekvatna down regulacija receptora, primena GnRh agonista počinje u lutealnoj fazi ciklusa koji prethodi stimulaciji, a u slučaju ultradugog protokola i na više ciklusa koji prethodne stimulationsom. Omogućava fleksibilniji pristup u započinjanju stimulacije, pa se mogu programirati stimulationsi protokoli za grupu žena istovremeno. Jedini nedostatak ovog protokola je relativno duži period stimulacije i potrebne veće doze egzogenih gonadotropina za postizanje efekta, kao i visoki troškovi.

U tipičnom protokolu sa upotrebom GnRh agonista se počinje u srednjoj lutealnoj fazi (20-22 dan ciklusa) u dobu kada su nivoi endogenih gonadotropina niski i njihovo akutno oslobađanje iz hipofiznih depoa „Flare“ efekat, teško da će dovesti do folikularnog rasta (Meldrum i sar., 1988; Urbansek, Witthaus, 1996).

Ako se sa primenom počne u ranoj folikularnoj fazi, vreme za postizanje down regulacije i desenzitizacije je duže, kao i učestalost pojave cističnih formacija veća (Meldrum i sar., 1988).

Kod žena koje loše odgovore na stimulaciju prilikom upotrebe standardnog svakodnevnog GnRh agonist protokola od srednje lutealne faze, smanjivanje doza GnRh agonista na polovinu (Kowalik i sar., 1998) ili njihov prekid nakon 5 dana stimulacije gonadotropinima (Schachter i sar., 2001) ili prilikom početka stimulacije (Pinkas i sar., 2000; Wang i sar., 2002), dovodi do poboljšanja rezultata.

Idealno, supresija postignuta primenom GnRh agonista pre početka stimulacije se određuje nivoom serumskog estradiola manjom od 50 pg/ml i odsustvom folikularne aktivnosti ovarijuma (prisustvom folikula ne većih od 10-12mm registrovanih transvaginalnom sonografijom).

Preparati egzogenih gonadotropina se već 30 godina koriste za stimulaciju ovulacije.

Da bi se stimulacijom ovulacije u IVF postupcima dobilo više embriona i na taj način povećala verovatnoća nastanka trudnoće sa živorođenjem (Waterstone i sar., 1991, Nijis i sar., 1993), neophodno je stimulisati i razvoj i maturaciju većeg broja folikula. Takav multiplu folikularni razvoj se indukuje dnevnom administracijom FSH i ovakav vid stimulacije je u upotrebi od osamdesetih godina.

Sa počecima primene za stimulaciju ovulacije u ART su se primenjivali HMG (humani menopauzalni gonadotropini, menotropini), urinarni preparati sa aktivnošću FSH (75IU) i LH (75IU), ali nedovoljno prečišćeni uz prisustvo urinarnih antigenih proteina. Menotropini uvek sadrže i različite količine HCG, koje se dodaju da bi se obezbedila aktivnost LH, ali mogu poticati i iz drugih izvora. Danas su u upotrebi prečišćeni i visoko prečišćeni derivati menotropina HPP.

Pre oko 20 godina, razvijeni su za upotrebu prečišćeni uFSH (aktivnost 75IU) urinarni derivati otklanjanjem LH aktivnosti nivo manje od 1 LH IU, ali je ostala značajna količina urinarnih proteina (više od 95% proteinskog sadržaja) i zahtevali su intramuskularnu primenu (Giudice i sar., 1994). Današnji visoko prečišćeni preparati urinarni FSH sadrže aktivnost LH manju od 0.001 IU i znatno manji nivo urinarnih proteina (Wickland i sar., 1994), a mogu se primenjivati i subkutano.

Biotehnologijom rekombinovani preparati rFSH su postali dostupni od početka devedesetih godina (Chappel i sar., 1992, Olijve i sar., 1996) i to modifikovani na alfa lancu (folitropin alfa), a zatim i na beta lancu (folitropin beta). Rekombinovani humani FSH preparati ne sadrže urinarne proteine, i imaju manje varijacije u biološkoj

aktivnosti. Razvijene su i forme dugo-delujućih rFSH (konstrukcijom himernih gena koji sadrže C terminalni peptid beta HCG fuzionisan sa beta-FSH), čiji je poluzivot u plazmi tri puta duži (95 prema 32 sata), što omogućuje ređu primenu i komforniji protokol (tzv core folitropin alfa).

Rekombinantna forma humanog LH koja ima fizikohemijske, imunološke i biološke aktivnosti kao i humani hipofizeakni LH je odobrena za upotrebu u Evropi od 2000. godine (Le Cottonec, 1998.). Kliničke indikacije za upotrebi i iskustva sa ovim preparatima su još uvel limitirana.

Rekombinantni preparati koji sadrže rFSH i rLH sa najnovija generacija preparata nastalih genetskim inženjeringom i tek počinju da ulaze u kliničku upotrebu, a iskustva sa njima su minimalna.

Tradicionalno, zbog strukturne sličnosti i biološke aktivnosti kao LH, HCG je u upotrebi da simulira skok LH i izazove indukciju ovulacije u ciklusima sa primenom gonadotropina ili dugih stimulatora po ispunjavanju kriterijuma za maturitet. Iako je preparat HCG izolovan iz urina trudnica ili placentnog tkiva u širokoj upotrebi, od 2001. godina i rekombinantni HCG je dostupan u SAD sa sve većom upotrebom. Smatra se da je edoza od 250 mcg ekvivalentna urinarnom pteparatu od 5000-10000 IJ (Ludwig i sar., 2003, Chang i sar., 2001).

Najčešći preparati gonadotropina u upotrebi su urinarni visoko prečišćeni HMG, urinarni FSH i rekombinovani rFSH. S obzirom da postoji više vrsta gonadotropina, mnoge studije su se bavile poređenjem rezultata primene različitih vrsta gonadotropina r-hFSH i uHP FSH (Bergh et al, 1997, Recombinant Human FSH Study Group, 1995; Hedon i sar., 1995; Schats i sar., 2000.), r-hFSH i HPP HMG (Ziebe i sar., 2007) i HP HMG i HP U FSH (Westergaard i sar., 1996) ali do sada dostupni podaci i metaanalize, nisu pokazale superiornost bilo koje vrste gonadotropina.

Od uvođenja rekombinantnih FSH preparata, mnogo kliničkih studija je izvedeno sa ciljem utvrđivanja početne optimalne doze rFSH. (Out i sar. 2004) za standardnog pacijenta tj manje od 40 godina, regularnim ciklusima i normalnim FSH nivoom. Obična standardna doza za započinjanje je u rasponu od 100-250 IJ, u Skandinaviji 150 IJ, a treba težiti individualizaciji doze. Optimalna doza gonadotropina je ona koja osigurava razvoj dovoljnog broja folikula sa zrelim jajnim ćelijama, a pri tome minimalizuje rizik razvoja ovarijalnog hiperstimulacionog sindroma.

Težište ovarijalne stimulacije je poslednjih godina pomereno sa dobijanja maksimalnog mogućeg broja oocita na dobijanje adekvantog broja (kohorte) oocita koji će proizvesti kvalitetne embrione odnosno sa kvantitativne stimulacije na kvalitetnu stimulaciju, a ne kontrolisanu hiperstimulaciju.

Optimalni odgovor na stimulaciju se smatra kao razvoj najmanje 2 folikula dimenzija 17-18mm, uz razvoj nekoliko od 14-16mm, kao i koncentracija serumskog estradiola koja je u korelaciji sa brojem i veličinom folikula (obično 200-400 pg/ml po folikulu većine 14mm i više, ukupno 7 do 9 folikula. Odgovor na stimulaciju se vrši serijskim monitoringom počevši od 3 do 5 dana stimulacije, radi eventualne korekcije doza gonadotropina. Endometrijalna debljina i izgled se takođe serijski premeravaju i smatra se da je debljina od 8-9 mm i trilaminarni izgled poželjan za uspešan ishod (Bassil i sar, 2001; Check i sar.,1993; Dickey i sar., 1992).

Kada su ispunjeni uslovi za finalnu maturaciju folikula (najmanje 2 folikula dijametra 17-18mm, debljina endometrijuma veća od 7mm i zadovoljavajuće vrednosti serumskog estradiola po maturnom folikulu, primenjuje se hCG u formi urinarnog preparata 5000-10000 IU ili rekombinovanog 250 mikrograma.

High responders (preteran odgovor na stimulaciju, hipereaktivnost) označava odgovor povišene amplitude na standardne doze gonadotropina i manifestuje se u vidu masivnog uvećanja ovarijuma, prisutnog velikog broja folikula svih veličina (posebno intermedijarni veličina 12-14mm), eleviranog serumskog estradiola (više od 3000 pg/ml). Ovo stanje stvara povišen rizik za razvoj ovarijalnog hiperstimulacionog sindroma (OHSS) i načini regulacije su sledeći (Chen i sar., 2003):

- otkazivanje ciklusa odnos prekid terapije
- „coasting“ odnos prekid terapije gonadotropina uz nastavak primene GnRh agonista dok ne padne serumska koncentracija E2 na 1 do 5 dana, a zatim aplikacija HCG. I sa pokušanim pristupom na kraju se mora otkazati 20-30% ciklusa
- Produžavanje sa postupkom, uz zamrzavanje embriona i odlaganje embriotransfera za neki od sledećih ciklusa
- Odlaganje embriotransfera do 5 dana i stadijuma blastociste, dok traje detekcija znakova koji ukazuju na razvoj OHSS

Poor responders (slab odgovor na stimulaciju, nedovoljan) označava odgovor na stimulaciju sa razvojem tri ili manje zrelih folikula ili prethodan ciklus otkazan zbog

izostanka odgovora na terapiju (odusustvo razvoja folikula), pik estradiola manji od 500 pg/ml, ili razvoj manje od 3 folikula manje od promera 16, ili razvoj samo jednog maturnog folikula. Većina ovih pacijetkinja za 3 do 4 godine uđe u menopauzu. Kod ovakvih pacijetkinja je visok procenat otkazivanja ciklusa i visok rizik neuspeha. Ovakve žene predstavljaju veliki izazov u postupcima asistirane fertilizacije i predloženi su mnogobrojni protokoli za prevazilaženje ovakvog načina reagovanja:

- Dugi protokol sa visokom dozama gonadotropina (300-450 IJ)
- Ukidanje ili smanjivanje doze GnRh agonista u dugom protokolu čim počne primena gonadotropina uz visoke doze (Schachter i sar., 2001, Pinkas i sar., 2000)
- upotreba kratkog flare protokola sa GnRh agonistima i visoke doze gonadotropina (Surrey i sar., 1998)
- protokoli sa primenom GnRh antagonista, koji eliminišu dugotrajne supresivne efekte GnRH agonista (Copperman i sar., 2003)
- sekvencijalni protokoli sa primenom klomifen citrata i egzogenih gonadotropina
- sekvencijalni protokoli sa primenom letrozola i egzogenih gonadotropina, sa pretretmanom estrogenima u lutealnoj fazi

Sekvencijalna stimulacija sa GnRH agonistima i egzogenim gonadotropinima-Kratki („flare“) protokoli

Ovo je alternativni režim stimulacijer koji koristi oba dejstva GnRh agonista : inicijalnu kratku fazu agonističkog dejstva sa stimulacijom lučenja gonadotropina zbog akutnog pražnjenja depoa, a zatim i supresivno dejstvo na sopstvene gonadotropine sa dugotrajnom upotrebom.

Sistemski pregled koji uključuje 22 meta-analize poredeći dugi i kratki protokol je pokazao diskretno veću stopu trudnoća kod dugog protokola (Daya., 2000). Ovi rezultati se ne mogu primeniti na sve kategorije žena, jer studije nisu uzimale u obzir dijagnoze ili druge prognostičke faktore. Standarni kratki protokoli povećavaju broj folikula dobijenih stimulacijom i smanjuju procenat otkazivanja ciklusa kod žena sa lošim odgovorom uz napomenu da stopa trudnoća i porođaja u ovoj grupi i dalje ostaju niske (Karande i sar., 1997, Karacan i sar., 2001).

Nedostaci ovog protokola su smanjena mogućnost planiranja ciklusa, porast koncentracije androgena i progesterona zbog perzistiranja kasne funkcije žutog tela kod povećanog procenta žena, što sa svoje strane može prozvesti nepovoljne efekte na

kvalitet oocita, fertilizaciju i implantaciju (Gelety i sar., 1995).

Standardni kratki protokol uključuje primenu GnRh agonista od 2 do 4 dana ciklusa tokom 3 dana, a zatim eventualno smanjivanje doze, a sledećeg dana početak sa primenom gonadotropina 150-450Ij dnevno.

Ultrakratki (Ultrashort) protokol sa GnRh agonistima ograničava primenu agonista samo tokom 3 dana odnosno sa inicijalnom flare fazom, a zatim ih prekida i ovde prema očekivanom se suočavamo sa češćim prevremenim endogenim skokom LH. Zbog ovoga, navedeni protokol je u ređoj upotrebi sa rezultatima koji su slabiji i od dugog i standardnog kratkog protokola (Ron- El sar., 1992; Tan i sar., 1994).

Varijacija kratkog protokola uz predterapiju oralnim kontraceptivima donosi niz pogodnosti u vidu da ne indukuje povećanje androgena i progesterona i fleksibilniji je. (Cedrin-Durnerin i sar., 1996). Protokol kratki microdose uz primenu oralnih kontraceptiva može pokazati povoljne efekte za žene sa lošim odgovorom jer dovodi do povećanje koncentracije FSH, endogenog i samim tim manjom stopom otkazivanja ciklusa, većim nivoima pika estradiola, i povećanim stopama kliničkih trudnoća. (Tan i sar., 1994, Scott, Navot, 1994).

Terapija sa GnRh antagonistima i egzogenim gonadotropinima

Uvođenjem GnRh antagonista u stimulative protokole devedesetih godina, otvorilo je potpuno novo poglavlje u postupcima stimulacije u IVF. Naime GnRh agonisti imaju inicijalnu fazu agonističkog delovanja odnosno stimuliše sekreciju gonadotropina iz hipofize, a zatim vremenski zavisnim mehanizmom vrše supresiju odnosno inhibiciju sekrecije gonadotropina i to desenzitacijom ćelija na GnRH odnosno nishodnom regulacijom receptora (smanjenje broja receptora). Antagonisti blokiraju direktno receptor za GnRH i to dozno-zavisnim mehanizmom sa trenutnim efektom po primeni. i nemaji inicijalni flare efekat.

Smatra se da su prednosti protokola sa primenom antagonista kraće trajanje terapije nego sa primenom agonista jer im je funkcija sprečavanje preranog skoka endogenog LH i primena kasnije u folikularnoj fazi kada su nivoi E2 već visoki, ne smanjuju odgovor ovarijuma na egzogene gonadotropine pa je potrebna i manja doza i kraće vreme za postizanje optimalnog efekta, i rizik razvoja ovarijalnog hiperstimulacionog sindroma je manji (Olivennes i sar., 2002; Felberbaum i sar., 2000; Ludwig i sar., 2001).

Nedostaci protokola sa primenom GnRh antagonista su intenzivnija supresija endogenog lučenja gonadotropina, zatim često nedovoljne koncentracije LH za razliku od protokola sa agonistima kod primene urinarnih ili rekombinovanih preparata FSH. U prilog ovoj tvrdnji govori sa pik koncentracije estradiola dostižu kada počinje upotreba antagonista i zato mnogi predlažu kod ovakvih slučajeva dodavanje i niskih doza Lh, HMG ili HCG kada se počne sa primenom antagonista. Rezultati nekoliko studija se naveli nešto nižu stopu trudnoća kod primene protokola sa GnRh antagonistima nego sa primenom GnRh agonista kao moguću posledicu uticaja GnRh antagonista na mitotičko programiranje ćelija u folikulogenezi, formiranje blastomera i razvoj i sazrevanje endometrijuma (Olivenes i sar., 2002; de Jong i sar., 2001; Al- Inany, Aboulghar, 2002). Antagonisti se danas obično primenjuju na dva načina u kliničkoj praksi odnosno fiksiran način sa početkom primene od 6 do 8 dana primene gonadotropina (Diedrich i sar., 1994) ili varijabilan režim kada vodeći folikuli dostignu 13 do 14mm. Bolji rezultati su dobijeni, kao i manje doze upotrebljenje kod individualnog pristupa (Ludwig i sar., 2002). Retko se primenjuju GnRh antagonisti u single dozi (3.0mg) koji sprečavaju prevremeni skok LH do 96 sati i ako se primene 6 do 7 dana stimulacije gonadotropinima ili kada vodeći folikul dostigne 14-14mm, u 75-90% slučajeva pokrivaju period do aplikacije HCG ili se nakon perioda od 96 sati zavisno od situacije dodaju pojedinačne doze (0,25mg) do primene HCG (Olivennes i sar., 1998, Olivennes i sar., 2000, Olivennes i sar., 2003, Fanchin i sar., 2003).

Velika meta analize koja je obuhvatila 5 studija je pokazala 5% manju stopu kliničkih trudnoća u protokolima sa antagonitima u odnosu na primenu agonista uz transfer istog broja kvalitetnih embriona. Takođe, u antagonističkim ciklusima je manja i totalna doza upotrebljenih gonadotropina, kao i dužina stimulacijesa, niže su maksimalne koncentracije estradiola, kao dobijen je manji broj oocita (Al- Inany, Aboulghar, 2002).

Više pristupa je predloženo u prevazilazenju ovoga i to više doze primenjenih gonadotropina (Wikland i sar., 2001) ili primena oralnog mikronizovanog estradiola u lutealnoj fazi ciklusa koji prethodi stimulaciji (4.0mg dnevno počevši od 20 dana lutealne faze do dana pre početla primene egzogenih gonadotropina). Smatra se da primena estradiola dovodi do izjednačavanja rasta i ujednačavanja dimenzija folikula pre početka stimulacije i na taj način povećava broj zrelih folikula, oocita i embriona. Ovako korigovana dinamika rasta folikula je slična onoj kod nishodne regulacije i

primene GnRh agonista u dugom protokolu i način poboljšanja rezultata protokola sa antagonistima (Fanchin i sar., 2003a; Fanchin i sar., 2003b).

Dve kategorije žena koji mogu profitirati od primene protokola sa antagonistima su one sa PCOS (Kolibrinakis i sar., 2003; Iskowitz-Eldor i sar., 2000) i one sa slabim odgovorom na stimulaciju (poor responders) bila je pretpostavka na početku primene kada nije bilo mnogo kliničkog iskustva (Nikolletos i sar., 2001)

Nerandomizovane studije koje su poredile upotrebu dugog protokola sa GnRh agonistima i protokola sa antagonistima kod onih sa slabom reakcijom pokazale su slične stope trudnoća, uz manje totalne doze gonadotropina i kraće trajanje stimulacije kod primene antagonista (Nikolettos i sar., 2001).

Randomizovane studije koje porede uspešnost kratkog flere protokola sa mikrodozama GnRh agonista i protokole sa antagonistima kod onih sa slabom reakcijom su pokazale sličnu uspešnostu pogledu trudnoća uprkos nižim vrednostima maksimalnog estradiola dobijenih kod antagonista (Akman i sar., 2001).

Kod poor responder-a sa neuspešnom primenom standardnog kratkog protokola, tretman antagonistima je doveo do povećanja broja oocita, embriona i povećanje stope trudnoća od 24% (Fasouliotis i sar., 2003).

Međutim, činjenica da su rezultati tretmana poor respondera i dalje skromni, i da primena protokola sa antagonistima nije donela očekivani uspeh kod ove subpopulacije.

Nekoliko autora je izvestilo o mogućem uticaju protokola stimulacije ovulacije u IVF na pojavu aneuploidija kod embriona (Munne i sar., 1997, Katz-Jaffe i sar., 2005). takozvani srednji mild protokoli su predloženi kao način smanjivanja učestalosti pojave aneuploidija embriona. Autori navodi i obavezan dodatak LH stimulaciji, kao način modulacije kohorti i kvantiteta ovarijaalnog odgovora (Ziebe i sar., 2007).

PUNKCIJA FOLIKULA I ASPIRACIJA OOCITA

Transvaginalni pristup punkcije folikula i aspiracije oocita su prvi primenili u praksi Wickland i sar., 1985. Raniji pristupi su obuhvatali laparoskopsku punkciju folikula (Stephoe, 1968.), transabdominalni put (Lentz,1981) sa dvostrukim prolaskom kroz mokraćnu bešiku, periuretralno-transvezikalni put, pa do transvaginalne punkcije uz transabdominalni ultrasonografski nadzor Dellenbach i sar., 1984. Transvaginalni

pristup ultrasonografski navođene tehnike sa transvaginalnim sondama omogućava kratak put igle od vaginalnog svoda do folikula, dobru rezoluciju slike transvaginalnim ultrasonografskim sondama visokih frekvencija (5.0 do 7.5 MHz), nije neophodna opšta anestezija jer je manje bolna, ne zahteva punu mokraćnu bešiku, uz minimalnu distorziju pelvičnih organa što sve smanjuje rizik nastanka komplikacija. Ovako primenjena procedura je kraća u odnosu na prethodnu sa većim brojem prikupljenih oocita (Kyono K, 2005).

Od 1985. godine većina centara koristi metodu punkcije folikula transvaginalnim putem pomocu vodiča na transvaginalnoj UZ sondi, što je i metod najviše prihvaćen od strane pacijenata, a transabdominalni put prikupljanja oocita je rezervisan samo za specijalne slučajeve i obuhvata manje od 1% svih procedura (Feichinger, 1993).

Punkcija folikula se obično zakazuje 34 do 36 sati nakon primene stop injekcije (HCG). Svi folikuli veći od 10mm u postupcima IVM (in vitro maturation) bi trebalo odrediti za punkciju, kao i oni veći od 14mm u postupcima IVF. (Kyono K, 2005).

Neznatno produžavanje intervala više od 36 sati ne povećava znatno rizik ovulacije, proporciju loših oocita, kao ni stope uspeha u ciklusima sa primenom GnRh agonista (Dimitry i sar., 1991). Skraćivanje intervala između primene HCG i punkcije na manje od 34 sata dovodi do kolekcije manjeg broja oocita od predviđenog (Tan i sar., 1992).

Sama tehnika aspiracije oocita iz folikula je slična kod kliničara uz po potrebi višestruka ispiranja folikula medijumom. Upotreba manuelna sukcije folikula sa špricom ili primena mehanički automatizovane sukcije sa automatizovanim pumpama je još uvek stvar debate i neslaganja. Nekoliko izveštaja navode moguće oštećenje zone pelucide manuelnom aspiracijom folikula sa šrpic sistemom (Horhe i sar., 1996; Cohen i sar., 1986).

Sindrom praznih folikula (empty follicle syndrome) je situacija u kojoj pored dovoljne multifolikularne reakcije i razvoja, prilikom punkcije folikula izostaje dobijanje oocita. Javlja se u oko 0.5-2.0% svih stimulisanih ciklusa (Ben-Schlomo i sar., 1991) i smatra se da objašnjenje leži u nepravilnoj aplikaciji ili izostanku aplikacije HCG, mada je u većini slučajeva nepoznat uzrok (Khalaf, Brande, 1997; Ujgur i sar., 2003).

Transvaginalna punkcija oocita nosi sa sobom nizak rizik od komplikacija (Feischinger i sar., 1988, Hill, Nyberg, 1992), uz lako prepoznavanje ultrasonografijom struktura kao

što su polifolikularni ovarijumi, materica, grlić, crevne vijuge sa peristaltikom, ali uz limitiranu vizualizaciju malih krvnih sudova, nerava i uretera.

Komplikacije intervencije punkcije folikula su:

1. Krvarenja – različitog intenziteta, od vaginalnog do intraperitonealnog ili retroperitonealnog. Incidenca ukupnih krvarenja, nezavisno od lokalizacije je do 24% (Dessole i sar., 2002, Dicker i sar., 1993). Procenjen prosečan gubitak krvi intervencijom u toku 24 sata je 230 ml. Učestalost ozbiljnih intraperitonealnih i retroperitonealnih krvarenja je 0.0-1.3%. Intraperitonealna krvarenja su obično akutna, sa hemodinamskim disbalansom, poremećajima volumena i šokom, dok su retroperitonealna sa odloženom simptomatologijom i mnogo slabijom kliničkom slikom. Terapijske opcije za zbrinjavanja akutno nastalog krvarenja teskog uključuju otvorenu laparotomiju ili laparoskopsku hemostazu. Povrede ilijačnih krvnih sudova posebno vene ilijake mogu se i spontano zaustaviti, Hill i sar.1992., navode 2.4% mogućnost zamene vene iliacae i folikula prilikom punkcije. Vaginalno krvarenja različitog intenziteta kao posledica intervencije punkcije se javlja u 1.4 do 18.4% slučajeva i predstavlja tzv uobičajenu komplikaciju. Krvarenje je iz mesta uboda u svodu i obično se zaustavlja pritiskom na mesto uboda, retko zahteva suturu ili tamponadu vagine-(Tureck i sar., 1993).
2. Infekcije- sa učestalošću od 0.14%, u vidu pelvične in flamatorne bolesti do peritonitisa (Khelada, Ghani, 2007). Različite forme PID sa javljaju od 0.2-0.5% i rezultat su neadekvatne preoperativne tehnike (bakteriološki brisevi, parametri infekcije, primena asepsa), a rizik povećava i pozitivna anamneza na ranije epizode PID. Ukoliko se prilikom punkcije folikula, uradi i punkcija evidentnih endometrioma ili drugih ognjišta endometrioze, povećava se verovatnoća nastanka PID kao komplikacije (Moini i sar., 2005). Ako se razviju obostrani tubo-ovarijalni abseci uz teško opšte stanje, postoji tendencija progresije bolesti i kompromitovanje celog postupka IVF (Khelada, Ghani, 2007). Ozbiljna komplikacija PID i sepsa je i pojava DIC i potrošne koagulopatije, sa potencijalno letalnim efektima ako se dijagnoza ne postavi na vreme. Infektivne komplikacije intervencije se obično manifestuju nakon nekoliko dana, mada su opisani i slučajevi koji su počeli mesecima po proceduri odnosno u drugoj polovini trudnoće (Sharp i sar., 2006).

3. Povrede-creva -. Veoma su retke i nastaju slučajno usled prisustva pelvičnih adhezija ili usled neiskustva operatora. U najvećem broju slučajeva su neprepoznate u toku intervencije, sve dok se ne pojave bolovi i znaci nadražaja peritoneuma, infekcije i peritonitisa odnosno ileusa. Tretman zahteva hitnu laparotomiju (Dessole i sar., 2002).
4. Vagalni refleksi -obično posledica peritonealnog nadražaja, akutna su pojava, ne zahtevaju terapiju.
5. Neurološke povrede- opisano je do sada samo nekoliko težih neuroloških povreda u toku ART procedura. Vizualizacija nerava transvaginalnom sonografijom je izuzetno teška, ako ne i nemoguća, pa su zadesne punkcije nerava malog kalibra česte i neprepoznate. Neurološke komplikacija u vidu cerebrovaskularnog insulta su sekundarne posledice trombo-embolijskih događaja i pratioci postupka ovarijalne hiperstimulacije i još češće razvoja OHSS.(Demirrol i sar., 2007).
6. Torzije adneksa
7. Jatrogene salpingocenteze
8. Retke povrede -kičme, uretera, abdominalnih mišića. Navode se perforacija vagine (Cho i sar., 2004), vertebralni osteomijelitis (Almog i sar., 2000) dva slučaja periumbilikalnog hematoma sa pozitivnim Cullenovim znakom (Bentov i sar., 2006) i hematom m.rectus abdominis (Wangi sar., 2005).
9. Do sada je opisano šest slučajeva povrede uretera u toku aspiracije oocita, najčešća forma uretero-vaginalne fistule (Mongiu i sar., 2009). S obzirom na lokalizaciju uretera napred i bočno u odnosu na gornji svod vagine, veoma je iznenađujuće da se povrede uretera ne javljaju sa većom frekvencijom. Samo je jedan slučaj opisan kao akutna povreda (u toku 24 sata od intervencije) a svi ostali su postali manifestni od 7 dana do nekoliko meseci nakon intervencije (Coroleu i sar. 1997; Jones i sar., 1985). Prvi slučaj povrede uretera su opisali Jones i sar., 1985 kod pacijetkinje sa endometriozom gr III i adhezijama u maloj karlici uz posledičnu dislokaciju uretera, što je olakšalo nastanak lezije u toku procedure.

TEHNIKE FERTILIZACIJE IN VITRO

Fertilizacija oocita se danas izvodi na dva načina klasičnom mikroinseminacijom (IVF)

ili ICSI metodom. U izveštaju o rezultatima IVF postupaka u Sjedinjenim Državama za 2001. godinu, 19% ciklusa je imalo samo indikaciju muški faktor, a u dodatnih 18% muški faktor je bio u kombinaciji sa drugim faktorom steriliteta (CDC; ASRM, 2003). Interesantno je da je ICSI metoda upotrebljena kod 80% parova sa muškim infertilitetom kao jedinim uzrokom, sa uspešnom kompletiranim ART postupkom.

Tehnika asistirane fertilizacije su razvijane kao način da se postigne i pomogne penetracija spermatozoida u zonu pelucidu. Prvobitne metode uključuju ZD (zona drilling) sa upotrebom mikropipeta i acidifikovanog Thyroid rastvora ili lasera, (Schomher, i sar., 1992) metodu parcijalnog prolaska kroz zonu (PZD) tj otvaranje zone sa mikroiglom (Malter i sar., 1989) i subzonalne inseminacije ili insercije (SUZI) sa injekcijom spermatozoida u perivitelinski prostor (Fischel i sar., 1991). Sve navedene metode su zahtevale kontakt spermatozoida sa oolemom i omogućavale polispermatozoidnu fertilizaciju, pa je tek ICSI metoda prevazišla ove probleme.

Palermo i saradnici 1992. su prvi izvestili o uspešnoj trudnoći i rođenju bebe nakon ICSI fertilizacije.

Savremene indikacije za ICSI metodu obuhvataju:

- muški infertilitet-suboptimalni slučajevi u ejakulatu- (oligospermia sa manje od 5 000000/ml, astenospermia (manje od 5% progresivno pokretnih), teratospermia (manje od 4% morfološki normalnih)
- opstruktivne i neopstruktivne azospermije
- ranije neuspešne fertilizacije klasičnom metodom IVF mikroinseminacije (rescue ICSI)
- imunološki infertilitet sa prisustvom antispermatozoidnih antitela
- mali broj raspoloživih oocita kao osigurač metodama
- kod endometrioze sa lošim kvalitetom oocita
- ako se u postupku planira i preimplantaciona genetska dijagnostika (PGD) jer sa klasičnom mikroinseminacijom može doći do prijanjanja dodatnog spermatozoida za zonu i kontaminacije materijala za PCR (polymerase chain reaction)
- kod oocita koji su maturirani in vitro ili su posle krioprezervacije
- za sprečavanje transmisije HIV infekcije kod HIV pozitivnog muškarca i HIV negativne žene
- kod slučajeva infertiliteta sa neobjašnjivim uzrokom , bar kao deo metode fertilizacije

Uzorak semena se može dobiti masturbacijom neposredno pre ili nakon punkcije folikula, a dva metoda su u upotrebi za pripremu semena za fertilizaciju i to „swim up“ i centrifugiranje na osnovu gradijenta gustine. Metoda centrifugiranja na osnovu gradijenta gustine omogućava lakši odabir spermatozoida normalne morfologije i smatra se pouzdanijom i efektivnijom od „swim up“ metode, posebno upotrebljiva kada su neki parametri semena van striktnih kriterijuma. Izolovani uzorci se zatim inkubiraju u medijumima sa velikom koncentracijom proteina u periodu od 30 minuta do 240 minuta, u svrhu postizanja kapacitacije (Prakash i sar, 1998).

Klasičnom metodom IVF fertilizacija se sprovodi sa mikroinseminacijom svakog oocita tj inkubacijom sa 50.000 do 100.000 progresivno pokretnih obrađenih spermatozoida tokom 12 do 18 sati na temperaturi do 37.5 C u uslovima 5% CO₂ u vazduhu i 98% vlažnosti. Neophodno je da se kontaktom spermatozoida sa zonom pelucidom aktivira akrozomalna reakcija koja omogućava penetraciju kroz zonu i istovremeno kortikalna reakcija oocita, koja čini zonu pelucidu refraktarnom na penetraciju drugih spermatozoida odnosno sprečava polispermiju. Penetracijom spermatozoida se aktivira i oocit koji nastavlja sekundarnu mejotičku deobu, koja se završava sa izbacivanjem dugog polocita. Evaluacija fertilizacije se vrši 18 sati od mikroinseminacije sa pojavom dva pronukleusa i dva polarna tela u perivitelinskom prostoru. Konvencionalna metoda IVF postiže stope fertilizacije od 50-70%. Proces fertilizacije traje oko 24 sata i završava se prvom mitotičkom deobom.

Pojava poliploidije je nešto na šta se mora obratiti pažnja kada se primenjuje klasična metoda IVF fertilizacije. Mnogo ređe, do pojave poliploidije može doći i primenom ICSI metode. Poliploidni embrioni imaju normalne deobe, i ako se ne detektuju na vreme (detekcija u vreme fertilizacije prisutni dodatni pronukleusi), u kasnijim stadijumima su neprepoznatljivi. Oko 5-10% svih embriona su poliploidni sa češćom pojavom kod nezrelih oocita (čak do 30%) u odnosu na zrele (1-2%) (van der Venn i sar., 1985). Izuzev polispermije, mehanizam nastanka poliplodije obuhvata greške u funkciji deobnog vretena, neizbacivanje ili nerazdvajanje polarnog tela, što se dešava kod nezrelih oocita, oocite starijih žena ili prezrelih oocita.(Mc Faden, Langioi, 2000).

Kod primene ICSI metode nije potrebna akrozomalna reakcija spermatozoida niti fuzionisanje sa membranom oocita, kao u spontanoj koncepciji ili klasičnoj mikroinseminaciji IVF. Međutim aktivacija oocita se vrši pretpostavljenim

mehanizmom koji izaziva mehaničko pokretanje citoplazme oocita i membrane spermatozoida, ubrzano procedurom imobilizacije spermatozoida i nežnom aspiracijom i reinjeksijom citoplazme oocita (Gearon i sar., 1995).

Priprema oocita za ICSI

Citoplazmatska zrelost oocita nije uvek u korelaciji sa nuklearnom zrelošću, pa je i to predmet rasprave o preinkubaciji oocita pre mikrofertilizacije odnosno u praksi je vreme između aspiracije i mikrofertilizacije 30 minuta do 6 sati, odnosno optimalno najmanje 2 sata od denudacije.(Travessos i sar, 2001). Denudacija oocita je neophodna da bi se pravilno uočilo polarno telo oocita postavila u odgovarajući položaj i obuhvata enzimsko ili mehaničko čišćenje oocita od kumulusnih ćelija (hijaluronidaza). Koncentracija i vreme izlaganja enzimu mora biti ograničeno, da ne bi uticalo na degeneraciju oocita ili partenogenetsku aktivaciju, aktivaciju pronukleusa, kao i deobu i kvalitet embriona. Na invertnom mikroskopu se zatim procenjuje zrelost oocita odnosno prisustvo germinalne vezikule (GV), prvog polarnog tela, vakuola ili drugih nepravilnosti. Kod većine žena dobijena populacija oocita je heterogena sa različitim zrelosti i kvalitetom, pa se oko 9,8% ćelija nalazi GV, u metafazi I je 3.7% (bez polarnog tela) i 81,5% u metafazi II sa prisutnim polarnim telom (Bonduelle i sar, 1999).

Ćelije dobijene u stadijumima GV ili metafazi I se podvrgavaju maturaciji in vitro, a samo u retkim slučajevima se primenjuje ICSI metoda tj kada ima malo oocita ili kod izostanka fertilizacije naakon 24 sata od mikromanipulacije. Samo nekoliko trudnoća je zabeleženo od nezrelih oocita koji su maturirani in vitro (Jaroundi i sar., 1997).

Priprema spermatozoida za ICSI

Spermatozoidi za ICSI se mogu dobiti iz ejakulata, epididimisa i testisa i zavisno od toga, primenjuju se različite metode obrade sperme. Spermatozoidi dobijeni iz ejakulata se obrađuju klasičnim metodama centrifugiranja sa gradijentom ili swim up metodom (Liu i sar., 1994). Ako su u pitanju spermatozoidi iz epididimisa (opstruktivne azospermije), koji se skupljaju ako ih je malo, mogu se obrađivati na klasičan način, kao iz ejakulata. Kod neopstruktivnih azospermija se koriste spermatozoidi tj testikularno tkivo, obično su nepokretni i zahtevaju vreme za inkubaciju, obično 48 sati uz pomoć FSH i testosterona (Tesarik i sar., 2002).

Tokom ICSI procedure posebno treba obratiti pažnju na sledeće

- selekciju i imobilizaciju spermatozoida
- pravilno postavljanje oocita za postupak
- rupturu ooleme pre ubacivanja spermatozoida u oocitu

Dobijanje i selekcija spermatozoida za ICSI metodu

U kliničkoj upotrebi izostanak pojave spermatozoida u semenu na standardnom mikroskopskom pregledu označava kao azospermia. Oko 10-15% muškaraca sa problemom infertiliteta ima azospermiju (Jarow i sar., 1989).

Azospermiju možemo podeliti na opstruktivnu uz normalnu spermatogenezu (opstrukcija sistema spermatogenih kanala) i neopstruktivnu sa smanjenom ili odsustvom spermatogenezom (Sertoly cell only syndrome, arrest spermatogeneze na različitim nivoima, hromozomopatije, hipospermatogeneza).

Obstruktivna azospermija nastaje blokadom spermatogenih kanala od eferentnih kanalića do ejakulatornih duktusa i obično je posledica infekcije, jatrogenih povreda za vreme skrotalne ili ingvinalne hirurgije, ili kongenitalnih uzroka (kongenitalna agenezija duktusa deferensa, često bilateralna). Oko 40% svih azospermija su obstruktivnog porekla (Bhasin i sar., 2003).

Neopstruktivna azospermija je odraz primarne insuficijencije testisa usled testikularne bolesti ili je dejstvo nokse na testis sekundarno dovelo do azospermije supresijom spermatogeneze (endokrinološke bolesti, intoksikacije). Kod muškaraca sa neobstruktivnom azospermijom može postojati nizak nivo spermatogeneze i ognjišta u testisu, ali ti spermatozoidi teško preživljavaju transport epididimisom da bi dospeli u

ejakulat (Silber i sar., 1997).

U slučajevima neobstruktivnih azospermija ili teških oligoastenoteratospermija sa manje od 5 miliona spermatozoida u mililitru, rutinski se savetuje genetsko ispitivanje kariotipa i skrining na mikrodelecije Y hromozoma, kao i endokrinološko, pre ulaska u program asistiranu fertilizaciju (Sharlip i sar., 2002).

Kod muškaraca sa dokazanim fenomenom retrogradne ejakulacije, u slučaju neuspeha medikamentozne terapije, spermatozoidi se mogu dobiti iz mokraćne bešike nakon masturbacije u alkalizovanom urinu.

Čitav niz mikrohiruških i aspiracionih tehnika je razvijen kada iz ejakulata nisu dobijeni vijabilni spermatozoidi ili ih je veoma malo.

MESA (micro-surgical epididymal sperm aspiration) je otvorena tehnika dobijanja semena u toku vazo-epididimostomije ili kao izolovana procedura sa primenom kod onih sa bilateralnom agenezijom duktusa deferensa ili nekorigovanim drugim obstrukcijama. Ovako dobijena sperma se može podvrgnuti krioperzervaciji tradi multiplog korišćenja (Janzen i sar., 2000).

PESA (percutaneous epididymal sperm aspiration) je aspiraciona tehnika uz upotrebu igle i punkcije i aspiracije iz tubula epididimisa. Manje količine semena se dobijaju ovom metodom i često je nepogodna za krioprezervaciju uz manje zabeležene stope trudnoće nego postignute otvorenom tehnikom (Shrivastav i sar., 1994).

Kod muškaraca sa neobstruktivnim azospermijama, kao i kod onih gde sa tehnikama sperm aspiracije iz epididimisa nisu postignuti rezultati, primenjuje se dobijanje uzoraka sperme iz testisa.

TESE (testicular sperm extraction) je otvorena mikrohiruška tehnika ekstrakcije spermatozoida, najčešće primenjivana sa obezbeđivanjem dovoljnih količina materijala za krioprezervaciju.

TESA (testicular sperm aspiration percutaneous) je perkutana aspiracija testisa iglom ili perkutana biopsija (core biopsy percutaneous), ali sa najvećom primenom kod muškaraca sa normalnom spermatogenezom i opstruktivnim azospermijama (Friedler i sar., 1997).

Normalne trudnoće su zabeležene kod upotrebe dobijenih testikularnih spermatozoida sa TESE kod muškaraca sa kongenitalnom ili stečenom insuficijencijom testisa,

azospermijom nakon hemioterapije i Klinefelterovog sindromom (Chan i sar, 2001). Međutim, dobijanje spermatozoida kod neobstruktivnih azospermija je naporan zadatak i potrebne su multiple biopsije, što se lakše izvodi mikrodisekcijom kroz single inciziju nego multiplim random biopsijama.

Većina Centara za ART u ciklusima koristi spermu iz ejakulata (88.9%), zatim spermatozoide iz epididimisa (1.8%), a čak u 9.4% spermatozoide iz testisa. Morfologija ubačenog spermatozoida utiče na uspeh fertilizacije i uspeh trudnoće (De Vos, A, 2003).

Stope fertilizacije nakon primene ICSI metode sa spermom iz ejakulata je 60-70%, a u slučaju upotrebe epididimalne ili testikularne 55-60% (Bonduelle i sar., 1999).

Nepravilna fertilizacija ICSI metodom se konstatuje u 3% slučajeva uz prisustvo samo jednog pronukleusa i takve ćelije se ne transferišu, čak i ako se kasnije podeli zbog moguće partenogeneze izazvane hemijskim i mehaničkim faktorima. Ako se jave tri pronukelusa odnosno, dođe do poliploidije (u oko 4% slučajeva) i pored ubacivanja samo jednog spermatozoida, uzrok je najverovatnije neizbacivanje drugog polarnog tela u vreme fertilizacije (Staeesen i sar, 1997).

Kao način poboljšanja odabira morfološki najboljih spermatozoida za ICSI metodu razvijeni su različiti postupci.

Spermatozoidi sa mikrofertilizaciju se obično izabiraju slučajnim uzorkom od strane embriologa i to na osnovu morfoloških karakteristika i motiliteta. Međutim mnoge studije su navele da je prisustvo različitih defekata spermatozoida povezano sa nižom fertilizacijom, nižim stopama trudnoće i povišenim rizikom pobačaja (De Vos i sar., 2003; Vanderwalzen i sar., 2008; Cassuto, 2009).

Bartoov i sar., 2002. razvili metod po nazivom MSOME (motile sperm organelar morphology examination) koji proučava pokretne spermatozoide u real-time vremenu. Ovaj metod je postavio osnovu modifikovanog IVF postupka ili IMSI (intracytoplasmic selected sperm injection) tj metoda ICSI sa selektovanim spermatozoidom. Koriste se fazno.kontrasni mikroskopsi sa uveličanjem iznad 6300x (obični za ICSI koriste uveličanje do 200x do 400x) pri čemu se normalna morfologija spermatozoida karakteriše kao glatka, simetrična, ovalna konfiguracija glave sa homogenim nuklearnim hromatinskim masama, sa lokalnih poremećaja i sa prisustvom jedne

vakuole promera 0.78 ± 0.18 mikrometara (Kim i sar., 2014).

Od uvođenja metode, mnoge studije su prijavile do 50% smanjenje stope pobačaja sa IMSI metodom u odnosu na klasičan ICSI, kao povećanje stope trudnoća kod onih sa dva ili tri neuspešna pokušaja ICSI (Berkowitz i sar., 2006; Hazout i sar., 2006).

Međutim, studije koje su istražile efekat IMSI metode na kvalitet embriona u odnosu na ICSI kod muskaraca sa oligoasthenozoospermijom, nisu pokazale razlike u stopama fertilizacije ili visokog kvaliteta embriona (Kim i sar., 2014).

Mauri i sar., 2010. su naveli da IMSI ne poboljšava kvalitet embriona na 2 dan, a mnoge studije nisu našle korelaciju IMSI i ranog embrionalnog razvoja, kao ni stope embriona visokog kvaliteta 3. i 5. dana (Wilding i sar., 2011).

U početku IMSI metoda je predlagana za one sa višestrukim implantacionim neuspehom, kao i one sa vidljivom DNK fragmentacijom (Berkowitz i sar., 2006; Hazout i sar., 2006). Međutim, primećeno je da prisustvo vakuola u spermi je u vezi sa integritetom, denaturacijom i pakovanjem hromatina u DNK (Franco i sar., 2006). Istraživačke studije navode da kada je ICSI izveden sa abnormalnom spermom, posebno sa prisustvom vakuola, uočava se povezanost sa lošim razvojem embriona i usporenim deobama i to zbog DNK oštećenja spermatozoida ili aneuploidije embriona (Tesarik i sar., 2005).

Pokazan je poboljšani razvoj embriona i klinički uspeh kada je IMSI metoda primenjena nakon nekoliko klasičnih ICSI pokušaja kod parova sa muškim infertilitetom u vidu kliničkih trudnoća (33.3% vs 12.5%, implantacije (14.6% vs 6.3%) (Knez i sar., 2011; Kim i sar., 2014).

Druga metoda selekcije spermatozoida za ICSI se zasniva na sposobnosti vezivanja za hijaluronsku kiselinu tj PCSI. U toku spermatogeneze, za vreme modeliranja plazma membrane, zajedno sa formiranjem receptora za zonu pelucidu, formiraju se i receptori za hijaluronsku kiselinu (Huszar i sar., 2011). Vezivanje za hijaluronsku kiselinu kod spermatozoida je indikator povećane ćelijske zrelosti, vijabiliteta i intaktnog akrozomalnog statusa. Procenat morfološki normalnih spermatozoida po Tygerbergu je veća tri puta kod onih selektovanih hijaluronskom kiselinom, kao i imaju niži procenat aneuploidija i nižu stopu DNK fragmentacija (Parmegiani i sar., 2010).

U početku primene metode izvestan broj studija je pokazao povoljne efekte PCSI

metode na ishode ART (Parmeigani i sar., 2010). Međutim, velika studija koja je poredila nalaze PICS i konvencionalnog ICSI nije pokazala razlike u stopama implantacija i kvaliteta eembriona (Menezo i sar., 2010).

Jedina poboljšanja sa primenom ove tehnike su zabeležena kod uzoraka semena sa lošom morfologijom ili kompromitovanim vezovanjem hijaluronske kiseline, odnosno kod prisutnog muškog faktora infertiliteta (Worilow i sar., 2011), ali nei i nepoznatog faktora infertiliteta.

Naime, doprinos spermatozoida embriogenezi se može grubo podeliti u dva perioda. Prvi period počinje se faertilizacijom kroz period ranog embrionalnog razvoja do stadijuma embriona od 8 ćelija. Drugi, kasniji period ide od perioda osam ćelija (tačka aktivacije embrionalnog genoma) do rođenja i kasnije. U ranom periodu spermatozoid učestvuje u fertilizaciji, singamiji i prvoj mititičkoj deobi, ali ovaj period pokreće oocit sa sekundarnom mejotičkom deobom, kao i formiranjem proksimalnog centriola koji je neophodan za funkcinisanje vretena i mitozu embriona. U kasnijem periodu, kada se uključuju embrionalni geni, spermatozoid može uticati na embriogenezu svojim genomom. Ako postoje lomovi DNK u spermatozoidu, to može dovesti do lošeg razvoja na nivou blastociste, loše implantacije i povišenog rizika za spontani pobačaj. DNK lomovi će tako teško uticati na period embriogeneze pre uključivanja embrionalnog genoma (Tesarik i sar., 2005).

Znači, sperma sa DNK fragmentacijama će verovatnije uticati na implantaciju i rane gubitke trudnoće nego što će uticati na stope fertilizacije, brzinu deobe embriona i embriokvalitet 2 ili 3 dana.

Za sada obe tehnike selekcije spermatozoida, svoje rezultate postižu samo kod visoko selektovanih pacijenata sa muškim faktorom infertiliteta. Worilow i sar., 2011. godine je prijavio veću stopu implantacija i stope kliničkih trudnoća, uz smanje procentav ranih abortusa kada je selekcija za ICSI vršena metodom vezivanja hijaluronske kiseline. Samo kod pacijenata sa HBA (hyaluronan binding assay) skorom od 20-40% ili 50%, selekcija na osnovu hijaluronske kiseline pokazuje rezultate u poboljšanju ICSI ishoda. Ako je HBA iznad 65% (znači da 7 od 10 spermatozoida ispunjavaju selekcionu kriterijum čak i ako su izabranisani vizualno), nema značajnijeg poboljšanja rezultata.

Pravilno postavljanje oocita za postupak

Tokom ICSI procedure posebna pažnja se posvećuje na izbegavanje ubacivanja spermatozoida u citoplazmu oocita gde se pretpostavljeno nalazi deobno vreteno. Deobno vreteno je veoma osetljiva struktura i razvijene su tehnike za uočavanje deobnog vretena i smanjenje oštećenja ćelija u toku mikrofertilizacije (Stanković V, 2009).

Spindle View Imaging System je sistem za brzo uočavanje i merenje deobnog vretena, zone pelucide, drugih struktura. Ako dođe do povrede deobnog vretena to može da rezultuje promenom mesta koje za sobom nosi i premeštanje hromozoma sa posledičnom aneuploidijom. Ako potpuno uništimo deobno vreteno prilikom mikronaipulacije, dolazi do propadanja oocita (Fulka i sar., 1998).

Većina istraživanja pokazuje prisustvo deobnog vretena na periferiji ooplazme odmah ispod polarnog tela (Cohen i sar, 1998) i orijentacijom oocita tako da se polarno telo orijentiše na 6 ili 12 sati, smanjujemo mogućnost oštećenja ako injeciramo spermatozoid na 3 sata.

Ruptura ooleme prilikom ubacivanja spermatozoida

Pravilna tehnika ubacivanja spermatozoida u ooplazmu podrazumeva laganu aspiraciju citoplazme u mikroinjekcionu iglu, što je i potvrda ulaska u oolemu (Vanderzwalmen i sar., 1996).

Pucanja ooleme mogu biti:

- normalno kada se napravi udubljenje sa iniciranjem igla,
- trenutno pucanje kada oolema nije elastična i puca bez udubljenja (ovakav tip oocita često propada u toku ili posle intervencije ili daje abnormalnu fertilizaciju),
- teško pucanje kada mebrana puca tek nakon nekoliko bockanja i sa većim negativnim aspiracionim pritiskom. Kod ovih oocita potreban je poseban oprez jer kada se probode upliv citoplazme može biti nagao i oštetiti organela
- izostanak pucanja kada se nakon nekoliko ubadanja ništa ne desi

Ako oolema nije dobro ubodena, spermatozoid će se naći u perivitelinskom prostoru. Po uspešnom ubadanju igle, treba aspirirati samo malu količinu citoplazme, a zatim ostaviti spermatozoid sa minimalnom količinom medijuma da bi se koncentracija nefizioloških supstanci u oociti svela na minimum.

EMBRIOKULTURA

Sistem kulture u kome se nalaze embrioni nakon uspostavljanja fertilizacije izaziva sve veće interesovanje zbog mogućih kratkotrajnih ili dugotrajnih dejstva i njihovih posledica na same embrione. Kultura medijuma obuhvata različite kulture, koncentracija CO₂ (4-7%), broj gupe embriona (1-4), kao i različite vrste proteinskih suplemenata (rastvori humanih serumskih albumina, rekombinovani albumini, sintetski sastojci seruma) (Gardner i sar., 2001)

Sastav medijuma se mora prilagođavati stadijumu deobe embriona, odnosno bi trebalo da što više imitira fiziološke uslove. Prilikom spontane fertilizacije embrion se stvara i nalazi u tubi uterini, a zatim migrira u kavum uterusa i dolazi u kontakt sa endometrijumom.

Standardna kultura medijuma po sastavu podseća na tečnost prisutnu u jajovodima, uz uobičajene dodatke maternalnog seruma ili proteinskih derivata. U stalnoj težnji da se uslovi u kulturi medijuma što više optimalizuju, razvijeni su sistemi ko-kulture, u kojima se embrioni inkubiraju sa drugom ćelijskom linijom. Prvi pokušaji su rađeni sa tubarnim epitelnim ćelijama, a zatim uterinim ćelijama (Wiemer i sar., 1993), do autologih endometrijalnih ćelija. Međutim, ceo sistem ko-kulture je za sada pokazao samo delimičnu korist kod onih sa višestrukim neuspešnim implantacijama (Simoni sar., 1999), ali i dalje spada u kontraverzne pristupe.

Proširena kultura blastociste

Prva uspešna trudnoća nakon IVF postupka je nastala nakon transfera blastociste (Steptoe, Edwards, 1976.), ali danas se embriotransfer vrši i sa manjim stepenom razvoja embriona (dan 2 ili dan 3), čak i u stadijumu dva pronukleusa. Napredak, odnosno bolje razumevanje fiziologije embriona u deobi i implantacije, dovela je do razvoja tzv „sekvencijalnih“ medijuma, odnosno variranja u sastavu medijuma zavisno od stadijuma razvoja embriona (Gardner i sar., 2000).

Embrioni pre stadijuma morule preferiraju piruvat kao nutritivni i neesenacijalne aminokiseline (u visokim koncentracijama su nađene u jajovodu), dok embrioni nakon kompakcije više upotrebljavaju glukozu i esencijalne aminokiseline (nađene u visokim koncentracijama i endometrijumom odnosno uterusu) (Gardner i sar., 1996; Gardner i sar.,

1998).

Smatra se da su prednosti kulture blastociste:

- omogućava bolju procenu vijabilnosti embriona (počinje aktivacija embrionalnog genoma, Miller i sar, 2001) .
- isključivanje embriona sa limitiranom sposobnošću rasta (Lane, 2002)
- omogućava bolju sinhronizacija rasta embriona i stadijuma razvoja (receptivnosti) endometrijuma. Embrioni nakon stadijuma morule razvijaju transportni epitel na taj način bolju regulaciju intracelularnog metabolizma i sposobnost adaptacije na uslove sredine (Edwards i sar. 1998; Lane i sar., 2001) Sposobnost adaptacije embriona do stadijuma 8 blastomera na uslove sredine (često neprijateljske), da prežive i nakon toga se uspešno implantiraju na stres koji nastaje tom prilikom može kompromitovati vijabilnost embriona više nego u stadijumu blastocite (Lane i sar., 1998).
- omogućava vreme za preimplantacioni skrining i dijagnostiku
- smanjuje rizik od ekspanzije embriona nakon transfera zbog kontrakcija uterusa, kao i izlaganje nefiziološkom hormonskom milieu u slučajevima teških OHSS i ometanje implantacije (zbog vremena da se dostigne stadijum blastociste in vitro, smanjuje se dejstvo štetnih efekata visokih koncentracija gonadotropina i steroida) (Pellicer i sar., 1996; Simon i sar., 1998; Franchin i sar., 1998).
- ima diskutabilno veću stopu implantacija. Embriotransfer blastociste 5. ili 6. dana ima stopu implantacija 30-60%, manje nego stadijum blastomera (12-20%). (Schoolcraft i sar., 2000, Wilson i sar., 2002). Međutim, samo 50% fertilisanih oocita dostigne stadijum blastociste (Edwards sar., 1999).

Dosta IVF Centara zagovara transfer embriona 2. ili 3. dan u stadijumu blastomera uz navođenje nepovoljnih efekata kulture blastociste:

- ne može popraviti kvalitet embriona i njegov potencijal rasta, bez upotrebne vrednosti kada imamo na raspolaganju manji broj embriona ili embrione nezadovoljavajućeg kvaliteta
- možemo ostati bez embriona za transfer zbog nedostatka embriona, jer embrioni koji se mogu implantirati 2. ili 3. dana, mogu da ne uspeju da dođu do stadijuma blastocite in vitro. Postavlja se pitanje da li su više stope implantacija blastociste samo posledica bolje selekcije kvalitetnih embriona, i da li kod embriona nižeg kvaliteta uopšte ima opravdanja za produžene embriokulture. Naime, i embrioni lošijeg kvaliteta (sporo deleći, prisustvo fragmentacija) koji se mogu uspešno implantirati 2. ili 3. dana, neće preživeti kulturu i smatra se da bi stope implantacija bile još niže (Alikani, 2000).

- većinu embriona koji će verovatno napredovati do stadijuma blastociste možemo identifikovati već 3. dana, što čini produženu kulturu nepotrebnom
- stopa multiplih trudnoća nakon transfera 2 blastociste je često veća nego transfer istog broja embriona 2. ili 3. dana (Gardner i sar., 2000; Gardner i sar., 2004).

Kultura blastociste se danas rutinski i ravnopravno primenjuje kao i kulture blastomera, a u nekim centrima je rezervisana samo za one sa dobrom prognozom i dovoljnim brojem embriona, koji transferom samo 1 ili 2 blastociste imaju najveće izgleda za uspeh uz redukciju verovatnoće za nastanak multiplih trudnoća većeg reda.

Blake i sar., su 2002. godine prikazali rezultate meta-analize koja je uključila 10 velikih studija gde su poređeni ishodi transfera 3. dana u odnosu na transfere 5. dana bez nađene statistički značajne razlike u pogledu stopa implantacija, trudnoća, živorođenja, abortusa, multiplih trudnoća i većeg reda, niti veća stopa otkazivanja transfera u odnosu na produženu kulturu. Problem sa ovim studijama je što mnoge nisu koristile sekvencijalne medijume, a kod onih koje jesu, stopa implantacija je bila veća uz istu stopu trudnoća, iako je transferisano nekoliko embriona.

PREIMPLANTACIONA GENETSKA DIJAGNOSTIKA I SKRINING

PGD (preimplanation genetic diagnosis) je prvi put uspešno primenjena 1990. godine za selekciju ženskog embriona kod para sa rizikom za prenos X vezane bolesti (Handsyde, Alt, 1990). Prvobitna ideja je podrazumevala da se parovima koji su nosioci genetskih alteracija, i u najvećem broju slučajeva imaju već rođeno afektirano dete, omogući da se pre primene invazivne dijagnostike u trudnoći, omogući rađanje zdravog potomka odabirom nakon testiranja embriona i transferom neafektiranih u ART postupku. U početku je metoda primenjivana samo za monogenske bolesti (cistična fibroza, hemofolija, Ducheneova mišićna distrofija), kao i bolesti vezane za polne hromozome, a zatim je spektar proširen na detekciju hromozomskih aberacija i prisustvo translokacija kod bilo kog partnera. Najnovije metode obuhvataju celokupan hromozomski skrining svih 23 para hromozoma kod embriona odnosno PGS (pre-implantation genetic screening) za detekciju aneuploidija i translokacija u humanom embrionu u selektovanoj populaciji bez dokazanog rizika (Hanton i sar., 2012).

U poslednjoj deceniji PGD je pronašao primenu kod onih poremećaja sa visokim

rizikom za kancerogenezu, RH inkompatibilije, mitohondijalne bolesti, kao i određivanje HLA sistema (Seeho i sar., 2005; Fiorentno i sar, 2004; Kuliev i sar., 2005). PGD je našla primenu i kod određivanja pola embriona, kao i detekciju aneuploidija i strukturnih aberacija hromozoma (translokacije, inverzije),(Munne i sar., 2003).

PGD se primenjuje na različitim nivoima razvoja embriona i to

1. biopsija polarnog tela oocita pre i nakon fertilizacije (Kuliev i sar., 1998). Danas se rutinski koristi samo u nekoliko zemalja (Austrija, Nemačka, Švajcarska), gde zakonski nije dozvoljena biopsija preimplantacionog embriona. Može se koristiti biopsija prvog polarnog tela ili u stanju pre singamije (nakon ICSI procedure), a zahteva i biopsiju II polarnog tela (Milachic i sar., 2014). Metod ima više nedostataka nego prednosti i to odsustvo informacija o aneuploidnim promenama u paternalnom genomu, kao i promena porekla same mitoze, zatim zahteva veliku količinu polarnih tela, kao i potencijalno nepotrebne količine kitova i obim dijagnostike (neće sve oocite biti fertilisane, a neće ni svi zigoti dostići stadijum blastociste), veoma je skup. Moramo imati na umu i mogućnost kompenzacije aneuploidija je 2-9% a inače je visok rizik prisutnih aneuploidija 32.5% (Capalbo i sar., 2013). Eventualna primena metode je selekcija oocita pre IVF koje su pogodne za IVF, kao i poboljšanje rezultata sa oocitima u IVF.
2. biopsija u stadijumu blastomera (Deobe) . Embrioni u deobi 3. dana još uvek pokazuju visok rizik za prisutvo mozaicizma 55-73% (Bielanska i sar., 2002; Munne S, 2006) gde najmanje jedna blastomera ima drugačiji hromozomski set od ostalih u embrionu (Vaumeste i sar., 2010, Johnson i sar., 2010). Situaciju dodatno otežava i činjenica da mnogi embrioni u ovom stadijumu koji se dele i koji su dijagnostikovani kao aneuploidni biopsijom blastomera, će uraditi “samokorekciju” ploidiije do stadijuma blastociste, pa otpisivanje ovakvih embriona smanjuje šanse za uspešan ishod (Barbasch-Hazan i sar., 2009;Frumkin i sar., 2008). Odstranjivanje jedne blastomere u toku PGD, izgleda da nema izraženo nepovoljni efekat na vijabilnost embriona. Radi preciznosti dijagnostike, savetuje se odstranjivanje dve blastomere zbog navedene pojave mozaicizma embriona u fazi 3 dana .
3. biopsija trofoektoderma (TE) u stadijumu blastociste. Johnson i sar., 2010 godine, navode da je u mnogo manjem procentu zabeleženo pojava mozaicizma kod

blastociste odnosno između unutrašnje ćelijske mase (ICM) i trofoektoderma (TE), kao i između frakcije trofoektoderma i iznosi samo 3.9%. Takođe, i stopa aneuploidija je niža kod blasociste sa 38.8%, nego kod embriona u stadijumu blastomera sa 51%.

Suština ove tehnike je izdvajanje ćelija preimplantacionih embriona u programu IVF, genetsko testiranje ćelija i embriotransfer ili krioprezervacija embriona. I pored evidentne opravdanosti i dokazane koristi metode kod parova sa dokazanim genetskim poremećajima, ove metode su veoma invazivne sa mogućnošću oštećenja embriona.

Ako se primeni metoda PGD na embrion u stadijumu blastomera, to može negativno delovati na uspeh procedure, dok primena dijagnostike na blastocistu 5. dana (kada se bioptirani embrioni podvrgnu krioprezervaciji), dozvoljava biopsiju ćelija koje nisu direktno uključene u formiranje embriona za razliku od ćelija unutrašnje ćelijske mase (Milachic i sar., 2014).

Procenat trudnoća po transferu nakon PGD ide od 63-70.5%, kada se nakon procedure u stadijumu blastociste uradi transfer 1 zamrznutog embriona u narednom ciklusu (Milachic i sar., 2014).

Problemi vezani za genetsku dijagnostiku samo pojedinačne ćelije su neuspeh amplifikacije, preferencijalna aplikacija, gubljenje alela (ADO-allele dropout), kao i kontaminacija stranom DNK. Ovi problemi su zbog raspolaganja samo jedne ćelije više izraženi kod biopsija polarnog tela i blastomera, ali zato kod tkivne biopsije trofoektoderma gde imamo 10-15 ćelija, svode se na najmanju meru, uz značajno niže troškove (McArthur i sar., 2008).

Hromozomska analiza u PGD se vrši FISH tehnikom i to za 9 hromozoma, uključujući one najčešće u aneuploidijama (X, Y, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22) i može se ispitati sa dve sekvencijalne FISH analize u jednoj blastomeri (Munne i sar., 2003). Fish je i uobičajena metoda za određivanje pola i skrining za najčešće aneuploidije. Tehnika je bazirana na hibridizaciji denaturisane DNK interfaznih hromozoma koje su označene sa različitim fluorobojama. Korišćenjem specifičnih proba sa tačkama prekida ili kombinacijom centromernih i telomernih proba, FISH razlikuje i hromozomski normalne, balansirane i nebalansirane hromozome embriona čiji su roditelji nosioci balansiranih hromozomskih translokacija. Ograničenja FISH metode kao glavnog alata

u PGS su se gomilale i čitav niz studija nije pokazao poboljšanje uspeha IVF uz PGS (Masterbroek i sar., 2007).

Za molekularne analize, PGD se izvodi sa PCR, koji podrazumeva amplifikaciju DNK sekvenci in vitro, ili direktno regiona potencijalne mutacije ili indirektnih markera segregacije alela. Efikasnost PCR može kompromitovati neuspeh amplifikacije, kontaminacija ili gubitak ispadanjem alela, što posebno pravi probleme kod heterozigota ili stanja sa autozomno dominantnim poremećajima.

Postoji više metoda CCS (comprehensive chromosome screening) uključujući Polimorfizam pojedinačnog nukleotida esej (SNP single nucleotide polymorphism array), CGH (comparative genomic hybridization) i kvantitativnu polimeraza lančanu reakciju (PCR-polymerase chain reaction).

Biopsija blastomera sa CCS je vrlo precizna (94.2%) u odnosu na biopsiju polarnih tela i biopsiju trofoektoderma sa istom metodom (Capalbo i sar., 2012).

Komparativna genomska hibridizacija CGH je novija tehnika zasnovana na PCR tehnologiji koja pruža mogućnosti za skrining ne samo nekih, već svih hromozoma u ćeliji, ali je vreme potrebno za analizu veliki limit za aplikaciju u PGD (Wilton L, 2002). Ovako se može čitav genom skenirati na hromozomekse abnormalnosti, iako poliploidiju i balansirane translokacije ne može detektovati. Za analizu traži 72 sata, što dovodi do problema sa embriotransferom, pa se najčešće mora raditi i krioprezervacija embriona (Basilie i sar., 2009).

Međutim, rutinska primena PGS kod žena odmakle reproduktivne dobi u postupcima IVF i uticaj na poboljšanje stopa živorođenja su još uvek stvar debata. Kako je aneuploidija humanog konceptusa najčešće rezultat greške u mejozi oocita, koje se povećavaju sa starenjem, logično je pretpostaviti korist od uvođenja ove metode kod žena odmaklog reproduktivnog doba. Čitav niz istraživanja je pokazao da starije žene, kao i one sa istorijom spontanih habitualnih pobačaja često produkuju više aneuploidnih embriona nego mlađe i one sa normalnom reproduktivnom anamezom. Ove grupe žena se vode pod visokim rizikom i smatra se da PGS selekcija embriona popravlja stope implantacija i smanjuje stope pobačaja, ali je sa nejasnim uticajem na stopu živorođenja (ESHRE PGD consortium, 2007).

PGS koji se koristi za skrining aneuploidija embriona kod hromozomski euploidnih

roditelja, obuhvata najmanje pretragu pet hromozoma uključenih u aneuploidije najčešće i to 13, 18, 21, X i Y. Kod žena odmakle reproduktivne dobi služi za detekciju aneuploidija, a kod infertilnih pacijenata za poboljšanje implantacije i to u slučajevima ponovljanog neupeha IVF u smislu implantacije, ponavljanih pobačaja, pacijenata sa teškim poremećajima spermatogeneze i u slučaju SET (Basille i sar., 2009).

Rutinski skrining aneuploidija embriona kod žena odmakle reproduktivne dobi u IVF programu još uvek nije pokazao očekivanu korist i ne savetuje se kao rutinska praksa. Dve randomizovane studije, gde je jedina indikacija za PGS bila odmakle godine majke, nije pokazala korist od izvođenja ni na stopu kliničkih trudnoća, ni na stopu živorođenja (Masterboek i sar., 2007; Staessen i sar., 2004). Bolje rezultate sa PGS nalazimo kod mladih žena, čiji su embrioni generalno bolje morfologije (Shapiro i sar., 2002), i samim tim manje vulnerabilni na proceduru biopsije, što povećava stopu živorođenja nakon primene (Staessen i sar., 2007).

NEINVAZIVNI PREIMPLANTACIONI GENETSKI SKRINING

Postoji tendencija da se invazivni preimplantacioni skrining polako prebaci u zonu neinvazivnog tj pokušava se povezivanje kvaliteta pojedinih parametara gameta (vakuole u glavi spermatozoida, položaj i izgled deobnog vretena kod zrelih oocita), zigota (intervali i izgled deobe zigota), embriona (dinamika i izgled deobe i razvoja embriona) sa njihovim ploidnim statusom odnosno prisustvom aneuploidija. Pri tome moramo imati na umu da je zabeležena visoka stopa aneuploidija u embrionima dobijenim IVF ili ICSI procedurama (Wilson i sar., 2002). Smatra se da je sudbina većine ovih embriona da se ne razviju do kraja, izostanak implantacije, a ako se implantiraju da završe kao različiti oblici spontanog pobačaja (Munne i sar., 2003). Aneuploidije se u visokom procentu kod humanih embriona javljaju kod žena odmaklih reproduktivnih godina ili kod onih sa anamezom spontanog pobačaja. (Platteau i sar., 2005). Takođe izveštaji ukazuju i na vezu kvaliteta spermatozoida, ovarijalne kontrolisane stimulacije i morfološkog kvaliteta embriona na prisustvo embrionalnih aneuploidija (Baant i sar., 2007).

a) metode selekcije spermatozoida za fertilizaciju

IMSI omogućava morfološki odabir spermatozoida za fertilizaciju pre ICSI procedure i poboljšava raniji nezadovoljavajući razvoj embriona kod parova sa lošim kvalitetom

spermatozoida.

Neke studije su pokazale da se sa pojavom velikih vakuola u glavi spermatozoida i njihovim brojem povećava i učestalost aneuploidija. Analiza sperme koja je urađena nakon IMSI selekcije je pokazala da postoji značajno bolja funkcija mitohondrija, status hromatina i euploidija nego u neselektovanim spermatozoidima kod kojih je i nađena povećana poremećena arhitektonika hromatina (Pedrix i sar., 2013).

Za sada indikacije za primenu IMSI su selektovana populacija sa teškim poremećajem spermatogeneze, gde povećava procenat kliničkih trudnoća i smanjenje procenta spontanih pobačaja (de Vos i sar., 2013) i teratozoospermija (Knez i sar., 2012) gde pokazuje poboljšan razvoj i kvalitet embriona.

b) Tečnost blastokele i DNK ekstrakcija bez biopsije

Metoda mikropunkcije blastociste i aspiracije blastokele 5. dana razvoja embriona je u početku izvođena radi mogućnosti dokazivanja pola embriona bez biopsije embrionalnih ćelija. Smatra se da bi ova solucija mogla da posluži u određivanju muških embriona kod X vezanih bolesti koji imaju visok rizik za bolest ili kod drugih aneuploidija (Pallini, i sar. 2013). Naime, PCR metodom je ustanovljeno da se genomska DNK nalazi u oko 90% uzoraka tečnosti blastokele dobijenih pre postupka vitifikacije embriona ICSI pipetom (D' Alessandro i sar., 2012).

Cohen i sar., 2013. godine su ukazali na nekoliko potencijalnih problema kliničke primene ove metode. Prvo, da DNK blastokele ne može da predstavlja odraz celog embriona, jer i kulture medijuma bez embriona često sadrže DNK frakcije. Zatim, izvor oslobađanja DNK u blastokelu su često degenerisane i abnormalne ćelije, pa svakako nije odraz intaktnih ćelija. Ova procedura nije u potpunosti neinvazivna, jer prilikom manipulacije može doći do oštećenja blastociste.

c) Proteomiksi, sekretomi, profili sekretoma embrionalnih

Embrioni koji su nastali od abnormalnih gameta imaju limitiran potencijal rasta i umanjene šanse da rezultuju kliničkom vijabilnom trudnoćom (Martinez i sar., 2010). Tehnikom mass spektrofotometrije (MS) su otkriveni različiti proteini sekretovani od strane embriona sa potencijalom da mogu poslužiti u svrhu skrininga hromozomske konstelacije preimplantacionog embriona (Mc Reynolds i sar., 2011).

Grupa istraživača je ukazala na lipocalin-1 kao potencijalni biomarker skrininga

aneuploidija, nađen je u sekretomu humanih blastocista u in vitro uslovima. Sekretom je metod baziran na analizi proteina u korišćenim kulturama medijuma, koji sekretuju pojedinačni embrioni. Smatra se da postoje razlike u sekretovanim proteinima u korišćenju kulturi medijuma između euploide i aneuploidne blastociste (Mc Reynolds i sar., 2011).

Razlika u proteinskim profilima sekretoma između individualnih morfološki sličnih blastocista dobrog kvaliteta, može da dozvoli diskriminaciju ploidnog statusa. Studija je pokazala set devet biomarkera TNF (tumor necrosis factor), IL-10 (interleukin), MSP-alfa (macrophage stimulating factor alpha), SCF (stem cell factor), GM-CSF (colony stimulating factor), MIP-1 beta (macrophage inflammatory protein 1-beta), lipocalin -1, TRAILR 3 (TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 3), hemokina (C-X-C motif) ligand 13 (CXCL 13) i nalaz proteinskog profila euploidnih blastocista se značajno razlikovao od profila sekretoma aneuploidnih. Najznačajniji podatak je da se poremećena ekspresija lipocalin-1 proteina vezuje za aneuploidiju, a ne neuspeh implantacije (Katz-Jaffe, 2009).

d) Embrionalni “time-lapse” monitoring kao skrining za detekciju aneuploidija

Studija Meseguera i sar., 2011, je pokazala da morfokinetika razvoja embriona je dobar prediktor uspešnosti implantacije, a samim tim pokazuje i povezanost sa aneuploidijama. “Time-lapse” tehnika se može primeniti kao sredstvo selekcije embriona i formiranje morfološkog sistema gradiranja embriona (Wong i sar., 2010). Tehnika podrazumeva sekvencijalno nadzor i snimanje embriona bez pomeranja iz kulture, i notiranje različitih događaja u određenom trenutku, koji su ne moraju biti kasnije vidljivi. Nekoliko parametara se izdvojilo kao značajno i sa korelacijom sa uspešnom implantacijom

- vreme do dostizanja stadijuma 5 ćelija (48.8-56.6 nakon ICSI)
- vreme između podele na 3 ćelije i kasnije deobe na 4 ćelije s2 (≤ 0.76 sati)
- vremensko trajanje drugog ciklusa deobe embriona (između stadijuma 2 ćelije i 3 ćelije) cc2 (≤ 11.9 sati)

Aneuploidija embriona koja je najčešći uzrok neuspeha IVF procedure, pokazuje korelaciju sa specifičnim morfokinetičkim varijablama embriona, i poslužila je za razvoj modela klasifikacije za rizik aneuploidije embriona. Campbell i sar., 2013.

godine su demonstrirali efikasnost ovog modela na nesektovanoj populaciji IVF parova gde nije rađen ni biopsio PGD ni PGS. Od 88 transferisanih blastocisti je izračunat rizik od aneuploidija (nizak, srednji, visok) na osnovu sudbine embriona, implantacije, fetalnih otkucaja srca i živorođenja. Značajne razlike su dobijene u kategorijama fetalne srčane frekvencije i živorođenja između embriona koji su kvalifikovani kao nizak rizik i srednji rizik. Unutar kategorije embriona niskog rizika, za kategorije srčane frekvencije i živorođenja su dobijene povećanje stopa od 74% i 56% u odnosu na sve blastociste. Na osnovu studije, pokazano je da specijalno dizajnirani neinvazivni modeli skrininga, mogu popraviti šansu za živorođenje za 56% u odnosu na konvencionalne metode skrininga.

EMBRIOTRANSFER

Tehnika i komplikacije embriotransfera

Transfer embriona se može vršiti od 1. do 6. dana nakon in vitro fertilizacije odnosno od stadijuma dva pronukleusa (2PN) odnosno zigota do blastociste. Uspeh postupka IVF zavisi od svakog pojedinačnog dela postupka (protokol stimulacije ovulacije, postupka aspiracije, laboratorijskih uslova i metode in vitro fertilizacije, kultura medijuma, postupaka sa embrionima i ćelijama).

Glavi limitirajući faktor postupka je izostanak (neuspešnost) implantacije kod naizgled odličnih embriona gradusa A imajući u vidu da 90% ovakvih embriona, transferisanih u matericu, ne uspeva da da znakove povezivanja sa endometrijumom i predodređeno je da nestane (Prapas i sar., 2002).

Sama tehnika embriotransfera, za razliku od ostalih etapa, je doživela veoma malo modifikacija i izmena još od početaka primene opisana od strane Stricklanda i sar., 1985. Udeo postupka embriotransfera na uspeh celokupnog IVF je često precenjivan, zbog činjenice o morfološki idealnim transferisanim embrionima i izostanku implantacije, pa je optuživana tehnika transfera ili lekar koji je uradio postupak.

Proces implantacije embriona u humanoj populaciji je još uvek slabo razjašnjen i smatra se da uspeh nakon embriotransfera zavisi i od kvaliteta embriona (godine žene, broj transferisanih embriona, broja pokušaja embriotransfera, kao i prisustva krvi u mukusa u unutrašnjem kateteru).

Dosta autora navodi "lak embriotransfer" kao preduslov uspeha IVF metode, veće stope

trudnoća u odnosu na težak transfer. (Mansour, 2002). Fanchin i sar., 1998. godine su primetili da veća učestalost uterušnih kontrakcija za vreme transfera povezana sa nižom stopom kliničkih trudnoća i živorođenja.

Tip teškoća koji određuje transfer kao težak obuhvata potrebu za promenom vrste katetera, upotrebu dilatatora i manipulacije sa grličem, zadržane embrione u kateteru, prisustvo krvi na vrhu katetera, prisustvo krvi na spoljne zidu katetera, krvarenje iz grlića, sve krvave transfere, transmiometrijalne transfere i sve tipove teškoća zajedno.

Da li je izbor katetera faktor od uticaja na uspešnost embriotransfera je još uvek stvar oprečnih stavova i neslaganja. Mnoge randomizovane, kontrolisane studije su poredile efikasnost u ultrasonografski nadz različitih vrsta mekih i tvrdih katetera, sa rezultatima da je veća šansa postizanja trudnoće uz upotrebu mekih soft katetera u odnosu na tvrde, a bez razlike kada su tvrdi poređeni međusobno. (Bucket WM, 2006; McIlveen i sar., 2005). El-Shawaraby i sar., su 2008. su naveli slične stope trudnoća za upotrebu i mekih i tvrdih katetera za transfer.

Ultrasonografski nadzor embriotransfera je doneo poboljšavanje stope trudnoće zbog vizuelne kontrole mesta vrha katetera i puta prolaska katetera, u odnosu na transfer zasnovan na "kliničkom osećaju" odnosno na slepo (Prapas i sar., 2002). Naime, smatra se da ultrasonografski nadzor smanjuje verovatnoću dodirivanja fundusa vrhom katetera i izazivanje posledičnih materičnih kontrakcija. Smatra se, na osnovu još kliničkih podataka da kateter vrhom ne sme dodirnuti fundus (Coroleu i sar., 2002) i da se transfer se mora obaviti na rastojanju 0.5-1.0cm niže od fundusa (Franco i sar., 2004). Transfer u samom fundusu povećava rizik migracije embriona u tube i nastanak ektopičnog graviditeta, a nizak transfer cervikalno ili cervikalnu trudnoću ili ekspanziju embriona (Egbase PE, 2000; Frankfurter, i sar 2003).

Embrioni mogu biti izbačeni iz kavuma kao posledica materičnih kontrakcija ili odtrsanjeni i pomereni sa mesta transfera zbog adhezije na spoljašnji zid katetera ili dislocirani na neželjeno mesto zbog stvaranja negativnog pritiska prilikom naglog izvlačenja katetera (Schoolcraft i sar, 2001).

Manipulacije instrumentalne (dilatatori, kuglencangla) u toku transfera mogu dovesti do izazivanja materičnih kontrakcija sa posledicom izbacivanja embriona u tube ili kroz cervikalni kanal (Lesny i sar., 1999). Iste posledice izaziva i upotreba većih količina medijuma u transfer kateteru (veće od 50 mikrograma) ili većih količina mehurića

vazduha prilikom pakovanja embriona (Meldrum i sar., 1987).

Prisustvo mukusa u cervikalnom kanalu može zapušiti vrh katetera i dovesti do zadržavanja embriona u kateteru ili plasiranja na neodgovarajuće mesto, kao i izvor bakterijske kontaminacije kavuma i kompromitacije postupka (Franchin i sar., 1998). Ukoliko se krv nalazi u vrhu (unutrašnjosti) katetera, to se uzima kao nepovoljan prognostički znak, dok je prisustvo na spoljnoj strani katetera uglavnom kontraminacija (Salam i sar., 2002). Krv prisutna na vrhu katetera je najčešće rezultat lokalne traume endocervikalne sluzinice ili endometrijuma i povezuje se sa smanjenjem stopa trudnoća.

Embrioni koji su zadržani u kateteru nakon transfera, moraju biti transferisani u ponovnom pokušaju. Naime embrioni mogu biti zadržani u unutrašnjosti katetera ili adherirani na spoljašnji kateter najčešće zbog negativnog pritiska i naglog izvlačenja katetera iz kavuma, iako su transferisani uredno pre toga. Poseban problem je u slučaju gde je jedan embrion dobro transferisan, a nekoliko embriona zaostalo u kateteru. Uticaj retransfera na uspeh procedure još uvek nije razjašnjen. (Goudas i sar, 1998).

Najvarijabilnija stvar sa mogućim uticajem na uspeh je iskustvo lekara koji vrši transfer. Nekoliko studija je pokazalo značajan uticaj faktora lekara na rezultate (Karande i sar., 1999; Hearn-Stokes i sar., 2000), dok su drugi naveli da se takva povezanost ne može ustanoviti poređenjem rezultata u idealnoj populaciji pacijenata. (Laiwani i sar., 2004).

Receptivnost endometrijuma

Mnogobrojni pokušaji su izvedeni u cilju procene “pravog” pogodnog endometrijuma u IVF ciklusima, koji bi doveo do uspešne implantacije (Merce, 2002). Koncept endometrijalne receptivnosti odnosno prijemčivosti za prihvatanje embriona se može procenjivati na osnovu ultrasonografskog izgleda endometrijuma, debljine, subendometrijalnog protoka krvi i rasporeda vaskularizacije, zatim histološki nakon potezne biospije endometrijuma, kao i određivanjem steroidnih hormona (estradiol, progesteron).

Koncept minimalne debljine endometrijuma je opšte i široko prihvaćen. Uzimajući u obzir postupke IVF nekoliko studija je pokušalo da odredi minimalnu debljinu endometrijuma ispod koje trudnoća nije verovatan događaj i kreću se u intervalu od 5-8mm tokom kasne proliferativne faze odnosno 6mm (Gonen i sar., 1991; Coulam i sar., 1994; Friedler i sar., 1996), kao 7mm (Alam i sar., 1993), 8mm (Al Shawaf i sar., 1993),

kao i na dan transfera (Khalifa i sar., 1992).

Takođe je bitno, da nije samo tanak endometrijum, već i deblji hiperplasičan, iznad 13mm, negativan prediktor implantacije i trudnoće (Weissman i sar., 1999). Nema dovoljno podataka za uspostavljanje precizne veze debljine endometrijuma i verovatnoće nastanka trudnoće u ART programu. Kao implantacioni marker debljina endometrijuma ima senzitivitet 95-100%, ali sa visokom stopom lažno pozitivnih 78-97% i lažno negativnih (87-100%) prediktivnih vrednosti (Bassil, 2001; Merce, 2002).

Friedler i sar., 1996. godine na osnovu podataka od 25 velikih studija sa 2665 ciklusa IVF, u slučaju 17 studija nisu prijavili značajnije razlike u endometrijalnoj debljini konceptijskih i nekonceptijskih ciklusa. U istraživanje je uključeno 414 spontanih ciklusa, 3558 sa ovarijalnom stimulacijom u IVF, kao i 411 ciklusa sa upotrebom donacije oocita i preprijetom endometrijuma HRT (hormon replacement therapy). Prognošički faktori koji su uzimani u obzir su periovulatorna debljina endometrijuma, izgled endometrijuma, kao i brzina i oblik protoka u a. uterini.

Struktura endometrijuma i nene razlike su predložene kao diskriminatorski faktor između konceptijskog i nekonceptijskog ciklusa u IVF, a endometrijalna debljina ima predominantno pozitivan uticaj na verovatnoću nastanka trudnoće, merena na dan aplikacije hCG (Khochlidze i sar., 2005).

Postoje tri ultrasonografske klasifikacije pojave i izgleda endometrijuma koje su u upotrebi u IVF programima:

1. Prema Smithu i sar., 1984. razlikuju se 4 gradusa (A, B, C, D), po prisustvu haloa, refleksivnosti endometrijuma u odnosu na miometrijum
2. Po Gonenu i Kasperu 1990. navode se tri stadijuma razvoja endometrijuma to a) homogen, hiperehogen bez centralnog ehoa, b) intermedijarni izoehogeni obrazac i c) trilaminarni endometrijum sa unutrašnjim hipoehogenim i centralnim i perifernim hiperehogenim odjekom.
3. Po Sheru i sar., 1991. godine razlikujemo dva gradusa endometrijuma i to a) neslojeviti tj hipoehogen ili izoehogen u odnosu na miometrijum i b) višeslojni odnosno troslojni višestruki obrazac, "halo izgled".

Prognošička vrednost pojave višeslojnog endometrijuma je efikasnija nego kod drugih obrazaca (Seraffini i sar., 1994; Sher i sar., 1991), kod žena u postupku ART. Na pojavu

određenog obrasca rasta i izgleda endometrijuma nema uticaja vrsta i protokol kontrolisane ovarijalne stimulacije. Takozvani “ne-troslojni” endometrijum se često povezuje sa nekoncepcijskim ciklusima, iako se verovatnoća pojave implantacije ne može isključiti. Implantacija je moguća sa ovakvim tipom endometrijuma, ali je učestalost trudnoće veoma niska (Friedler i sar., 1996; Tan i sar., 2000).

Endometrijalni izgled niskog gradusa (u celini hipoeohogeni sa izostankom centralne ehogene linije) je često povezivan sa ne koncepcijskim ciklusima (Ueno i sar., 1991; Check i sar., 2000). Sher i sar., 1991. godine su opisali veću prevalencu tzv lošijih endometrijalnih stadijuma i obrazaca kod žena iznad 40 godina u odnosu na mlađe (24.4% vs 5%), kao i kod pacijetkinja sa uterinom patologijom u odnosu na one bez prisutne (85% prema 11%).

Izgled trolistnog ili troslojnog endometrijuma (i njegova debljina) ima visoku senzitivnost (79-100%), ali sa dosta lažno pozitivnih (57-91%) i visokom negativnom prediktivnom vrednošću (75-100%) (Weissman i sar., 1999).

Broj embriona za embriotransfer

Pitanje broja vraćenih embriona je u mnogim zemljama Evrope regulisano normativno (Ferraretti i sar., 2013), u Sjedinjenim Američkim Državama je na nivou preporuke (ASRM, 2004). Naime, praksa sa vraćanjem više embriona u IVF postupcima se uhodala od početka metode zbog nepoverenja u novu tehnologiju, još uvek nedovoljnog iskustva i željom da se postigne najveća šansa za trudnoću.

Glavni cilj IVF je da postigne maksimalne moguće stope trudnoća, uz smanjenje pojave multiplih trudnoća posebno višeg reda, odnosno jedna zdrava beba rođena u terminu. Verovatnoća uspeha IVF raste sa brojem transferisanih embriona, sve do tačke iznad koje se povećava rizik nastanka multiplih trudnoća (Engmann i sar., 2001).

Od početka primene metoda, radi poboljšanja uspešnosti i implantacija, povećavao se i broj vraćenih embriona od jedan na više od 4 embriona. Klinička iskustva pokazuju da je najveći broj trudnoća posle ART jednoplodne i pored vraćanja različitog broja embriona, a procenat porođaja kod multiplih trudnoća (blizanci i trojke) iznosi 20.2% u 2009. godini prema 21.7% u 2008. godini, 22.3% u 2007. godini i 20.85 u 2006. godini prema ESHRE registru. (Ferraretti i sar., 2013).

Kada su nam na raspolaganju kvalitetni embrioni za krioprezervaciju, manji broj

embriona može biti transferisan zbog pretpostavke verovatnoće implantacije (Sahla i sar., 2000). Starost majke i kvalitet embriona su najvažniji faktori koji utiču na implantacioni potencijal svakog pojedinačnog embriona (Shulman i sar., 1993). Ako se radi o transferu na nivou blastociste, može se transferisati manji broj embriona, jer je verovatnoća implantacije po embrionu 50% (Langley i sar., 2001).

Naime, za selektovanu populaciju je predloženo smanjenje broja embriona za transfer i kasniji transferi po jednog embriona iz pula krioprezerviranih. Belgija je 2003. godine donela uredbu o SET (single embryo transfer), transferu samo jednog embriona po ciklusu IVF kod žena mlađih od 36 godina. Stope blizanaca su se smanjile tokom 5 godina primene SET sa 25% na 10% (De Sutter P, 2006).

Poredeći rezultate nakon transfera različitog broja embriona do 2013. godine pronašli smo 14 randomizovanih studija sa 2165 žena, u Kokranovom registru kontrolisanih studija (Central, Embase, Medline). (Pandian i sar., 2013). Trinaest studija je poredilo ET 2 ili 3. dana (2017), a 2 su poredile transfer blastociste (415 žena), a samo jedan studija je poredila obe vrste transfera. Kada su u pitanju pojedinačni sveži IVF ciklusi, SET je povezan sa nižom stopom živorođenja nego DET. Međutim, nema značajne razlike u kumulativnim stopama živorođenja, kada se jedan ciklus DET poredi sa ponovljenim SET (ili dva ciklusa svežeg SET, ili jedan ciklus svežeg SET uz jedan ciklus cryoSET u spontanom ili hormonski stimulisanom ciklusu). Politika Set je povezana sa znatno nižim stopama multiplih trudnoća od svih ostalih. Platforma ponavljanog SET može da minimalizuje multiple trudnoće kod parova u ART, bez značajnijeg sniženja verovatnoće živorođenja. Međutim, navedeni podaci se uglavnom odnose na mlađe žene sa dobrom prognozom.

Kod onih sa dobrom prognozom odnosno manje od 35 godina, embrionima najvećeg kvaliteta, prvi ili drugi ciklus IVF kao predloženi modaliteti su SET, odnosno pojedinačni embriotransfer i zamrzavanje preostalih kvalitetnih embriona i njihovo sukcesivno vraćanje po jednog. U istoj populaciji DET (double embryo transfer) odnosno vraćanje dva embriona po jednom ciklusu kada nije ispunjen neki od uslova, zavisno od indikacija.

Kod žena od 35-39 godina, ne transferisati više od 3 embriona u svežim ciklusima, a ako imamo embrione najvećeg kvaliteta i pacijente sa dobrom prognozom, u prvom ili drugom ciklusu, uzeti u obzir SET ili DET. Kod žena iznad 39. godina, transferisati ne

više od 4 embriona u svežim IVF/ET ciklusima, a ako su embrioni najvišeg kvaliteta razmotriti embriotransfer 3 embriona.

Nekritična primena elektivnog SET će u populaciji sa suboptimalnim prognozom za uspeh će izazvati značajnu redukciju u efektivnosti u poređenju sa DET (JOINT SOGS-CFAS, 2008). U izvesnim okolnostima kod žena sa lošom prognozom ima multiple neuspešne IVF cikluse u anamnezi, može se transferisati i više embriona od preporuke. Kod žena sa medicinskim i obstetričkim kontraindikacijama za multiple trudnoće uvek treba transferisati manji broj embriona od preporučenog, a kada je opravdano i SET.

Na osnovu podataka ESHRE za 2009. godinu za Evropu SET je obuhvatio 24.2% (22.4% u 2008 i 21.4% u 2007., DET (double embryo transfer) 57.7% (53.2% u 2008. i 53.4% u 2007), transfer tri embriona u 16.9% (22.3% u 2008. i 22.7 u 2007. godini) i transfer 4 i više embriona u 1.2% (2.1% u 2008. i 2.5% u 2007. godini). Rezultati variraju zavisno od zemlje i iznose za SET više od 50% u švedskoj sa 70.7%, Finskoj 65.7% i Norveškoj 53.4%. Međutim, proporcija transfera 3 embriona je preko 40% svih transfera u Bugarskoj, Grčkoj, Makedoniji, Srbiji, Moldaviji i Crnoj Gori. Transfer 4 i više embriona je čak 41.2% transfera u Litvaniji (Ferraretti i sar, 2013).

KRIOPREZERVACIJA

Nakon rođenja prve bebe posle transfera zamrznutih embriona 1983. godine (Trounson A, 1983), usledila je revolucija u in vitro fertilizaciji sa izmenom postulata broja vraćenih embriona, smanjivanja incidence multiplih gestacija, smanjivanja potrebe za ponavljanim stimulacijama za svaki ciklus IVF, smanjenja broja odustajanja od ciklusa zbog nemogućnosti svežih transfera i objedinjeno povećavanja uspešnosti postupka.

Od ranije je primećeno da postupci za očuvanje vijabilnosti ćelija i fertiliteta bazirana je na skladištenju na niskim temperaturama, koje je reverzibilno i može trajati duže vreme. Primećeno je da se ćelije mogu prevesti sa nivoa fiziološke temperature na temperaturu tečnog azota -196C uz kontrolisanje formiranja ekstracelularnog leda i sa sprečavanjem formiranja intracelularnog leda. Međutim tokom prelaska na temperaturu od -196C, ćelije su pod uticajem brojnih nepovoljnih delovanja koje mogu rezultovati različitim stepenom oštećenja ćelije do smrti. U periodu tranzicije voda-led za prevenciju nastanka kristala koriste se supstance male molekulske mase i to permeabilni ili intracelularni krioprotektori (propanediol, dimetilsulfoksid, etilenglikol) i

ekstracelularni krioprotektori (sukroza, drugi oligosaharidi).

Klasična metoda podrazumeva "slow freezing" sa postepenim i kontrolisanim spuštanjem temperature. Nakon dve faze izlaganja prvo intraćelijskom protektantu, a zatim mešavini intraćelijskog i ekstraćelijskog protektanta, a zatim sledi sporo zamrzavanje bezinom od -2C/min, a zatim se na temp od -6C do -8C izaziva se namerna enukleacija leda dodirivanjem prethodno ohlađenim forcepsom. Na temperaturi od -30 do -40C gotovo sva ekstracelularna voda je prešla u led, a i sva intraćelijska je izvučena iz ćelije, i dalje postupak do postizanja -196C teče relativno brzo (Borini i sar., 2009).

Novija tehnika krioprezervacije vitrifikacija kombinuje ultrabrzo hlađenje sa visokim koncentracijama krioprotektora, što skraćuje vreme izjednačavanja temperatura. Tehnika je brza, mnogo jednostavnija i ne zahteva obimnu opremu kao prethodna. Step en hlađenja je 10000c/min i postiže se direktnim uranjanjem kapi sa ćelijama u tečni azot što eliminiše mogućnost stvaranja leda (Fabbri i sar., 2000). Smatra se da na današnjem stadijumu razvoja medijuma, nosača i skladišta uzoraka, u većini IVF laboratorija preživljavanje uzoraka bi trebalo da bude preko 90%, uz uključivanje i oocita (Chen i sar., 2003).

Krioprezervacija embriona

Nakon rođenja prvog deteta 1983. nakon transfera zamrznutih embriona (Trounson, 1983), Cohen i sar., su 1985. godine izvestili o uspešnoj trudnoći nakon transfera zamrznute blastociste.

Indikacije za krioprezervaciju embriona obuhvataju:

- krioprezervacija kvalitetnih embriona u svežim IVF ciklusima nakon transfera predviđenog broja embriona
- krioprezervaciju svih kvalitetnih embriona u slučaju potrebe odlaganja transfera (razvoj OHSS, prisustvo komplikacija punkcije, neadekvatan endometrijum)
- pre tretmana maligne bolesti ili operativnog lečenja
- za programe donacija embriona

Naime, smanjuje se broj potrebnih stimulacija ovulacije za postizanje uspeha sa multiplim embriotransferima zamrznutih embriona. Zatim, omogućava se vraćanjem SET ili DET uz zamrzavanje preostalih kvalitetnih embriona i smanjivanje stope

multiplih trudnoća u selektovanoj populaciji. Ova tehnika je i omogućila lakšu terapiju OHSS težih gradusa, bez propadanja dobijenih embriona.

Postavlja se pitanje uticaja postupka krioprezervacije na embrione i stope preživljavanja embriona nakon odmrzavanja. Dobijeno su kontradiktorni podaci o preživljavanju embriona dobijenih različitim metodama ART odnosno IVF klasičnim i ICSI metodom. Dok neke studije ne nalaze značajne razlike u preživljavanju embriona (Oehniger, i sar., 2000), neke navode lošije preživljavanje embriona i veću stopu spontanih pobačaja ako je primenjena metoda ICSI (Van der Abbel i sar., 2000).

Embrioni koji se zamrzavaju sa nalaze u stadijum zigota sa dva pronukleusa, najčešće u brazdanju (2. ili 3. dan) ili u stadijumu blastociste. Najčešće upotrebljavani metod je "slow freezing", dok vitrifikacija embriona polako preuzima primat sa dosta izveštaja o većoj stopi preživljavanja i embriona u brazdanju i blastociste. Nije nađena razlika u stopi trudnoća između ovih metoda. (Kolibriakis i sar., 2009).

Prema podacima ESHRE za 2009. godinu u Evropi je bilo ukupno 77799 ciklusa transfera zamrznutih embriona (FER) sa stopama trudnoća 20.9% po pokušaju i stopama porođaja 13.3% po ciklusu, što je niže nego u svežim ciklusima IVF/ICSI tj. 28.9% po aspiraciji za IVF i 28.7% za ICSI. Ukupno 109239 dece je rođeno kao rezultat ART, 79.4% nakon IVF/ICSI svežih ciklusa, 13.9% nakon FER i 6.7% nakon donacija oocita (DO). U Finskoj, Islandu i Švajcarskoj, jedno od 3 deteta iz ART je rođeno nakon krioprezervacije (Ferraretti i sar, 2013).

Postavlja se pitanje mogućeg delovanja, i štetnog, postupka krioprezervacije na perinatalni ishod i pojavu kongenitalnih malformacija kod ART dece nastalih ovim postupkom. Posebno se ukazuje na moguće neželjene efekte zavisno od vrste krioprezervacije.

Kako vitrifikacija koristi veće količine i koncentracije krioprezervatora koji mogu uticati na embrion i njegov kasniji razvoj, dodatno je što se kod transfera 2 ili 3 dan vrši krioprezervacija blastociste za koje se vezuje povišena učestalost nastanka monozigotnih blizanaca. U dosadašnjim izveštajima poređenjem svežih transfera blastociste nakon IVF i ICSI sa krioprezerviranim transferima blastociste nije nađena razlika u učestalosti kongenitalnih malformacija, neonatalnih komplikacija, kao ni povećana incidenca monozigota (Mukaida i sar., 2009). Ni druge studije rađene na manjim uzorcima nisu pokazale razliku u perinatalnom ishodu, pojavu kongenitalnih

malformacija vezanih za upotrebu krioprezervacije (Kolibriakkis i sar., 2009).

Krioprezervacija oocita i ovarijalnog tkiva

Indikacije za zamrzavanje oocita obuhvataju:

- zamrzavanje oocita kod razvoja OHSS višeg gradusa
- u slučaju nepredviđene azospermije partnera u aktuelnom ciklusu IVF
- na lični zahtev u slučaju odlaganja reprodukcije za određeni vremenski period
- pre terapije malignih bolesti
- za programe donacija oocita i embriona

Oociti se mogu zamrzavati u nezrelim formama i u zreom obliku u mezozi II. Pre krioprezervacije nezrelih oocita može uraditi in vitro maturacija, a oni su relativno otporni na termičke varijacije, opisano je samo nekoliko slučajeva živorođenja nakon odmrzavanja nezrelih oocita, pre svega zbog neuspeha in vitro maturacije (Smith i sar., 2010). Sa zreim oocitima prilikom krioprezervacije se navode prevremeno oslobađanje kortikalnih granula sa promenama u zoni pellucidi i nemogućnošću korišćenja IVF klasične metode (Vajta i sar., 2006), kao i osetljivost mikrotubula na varijacije temperature sa dezorganizacijom i depolimerizacijom sa posledičnom aneuploidijom (Katayama, 2003).

Efikasnost sa zamrzavanjem oocita se sa uvođenjem vitrifikacije popravila na preko 90%, u odnosu na 50-60% preživljavanja nakon "slow freezing" metode (Chian i sar., 2009). Studije su pokazale uspeh ART nakon krioprezervacije oocita sa stopama porođaja 21.6% po embriotransferu (Lobo RA, 2005).

Pre terapije malignih bolesti, uključujući i kod prepubertetske devojčice, danas se primenjuje zamrzavanje ovarijalnog tkiva bez prethodne stimulacije i zatim ortotopičnu ili heterotopičnu autotransplantaciju kada se stvore uslovi. Prvu uspešnu trudnoću sa živorođenjem nakon ortotopične transplantacije krioprezerviranog tkiva ovarijuma opisali su Donnez i sar., 2004.

Krioprezervacija sperme i tkiva testisa

Krioprezervacija semena je široko primenjena opcija u ART postupcima. Indikacije obuhvataju krioprezervaciju sperme ili punktata testisa u slučaju azospermije poremećaja i ejakulatorne disfunkcije u toku aktuelnog ciklusa IVF., kao i pre tretmana maligne bolesti.

Prilikom procesa krioprezervacije spermatozoidi su relativno otporni na brzinu postizanja temperature, glavni krioprotektor je glicerol, i stopa efikasnosti je 50-60%, što je sa obzirom na broj ćelija veoma prihvatljivo. Smanjenje fertiliteta spermatozoida nakon krioprezervacije je proporcionalno dužini zamrzavanja odnosno smanjenje vijabilnosti i motiliteta spermatozoida je pokazano, ali stopa trudnoća i fertilizacije nakon primene IVF ili ICSI metoda su iste kao i kod svežih uzoraka (Kuczynski i sar., 2001)

Krioprezervacija tkiva testisa se uspešno primenjuje u cilju očuvanja fertiliteta pre lečenja malignih bolseti, a praktično je i jedina opcija kod prepurtalnih dečaka. Za sada još nema evidentiranih slučajeva o heterotopičnoj ili ortotopičnoj transplantaciji testisa i eventualnim uspešnim reprodukcijama nakon toga. (Orwing i sar., 2005).

NEŽELJENI EFEKTI ART

Indikacije za postupak asistirane fertilizacije su muški faktor (oligozooastenospermia do azospermia), tubarni faktor, ovarijalni, uterini, imunološki, endometrioza, kao i njihove kombinacije. Postoji i značajna grupa pacijenata kod kojih je uzrok infertiliteta neprepoznat. Sve je više pristalica shvatanja da se ART postupak primenjuje već nakon dve godine neuspešne terapije infertiliteta drugim metodama.

Koja će se metoda IVF primeniti zavisi od više faktora (klasična in vitro fertilizacija, mikromanipulacija). Razlog za zabrinutost je posebno primena ICSI metoda (bitno se razlikuje od klasičnog IVF). Kod klasičnog metoda in vitro fertilizacije su imitirani laboratorijski uslovi koji su najbliži prirodnoj koncepciji, gde jajna ćelija „sama“ izabira spermatozoid. Suprotno tome, kod ICSI je taj proces samostalnog odabira spermatozoida izvodi embriolog na osnovu principa odabira i na ovom mestu dolazi do pitanja da li se ovde može izmeniti ono što priroda nije uspela.

Poželjan ishod postupka asistirane fertilizacije je jedna, zdrava beba rođena u terminu, a ne ni biohemijska trudnoća, ni višeploidne trudnoće, ni trudnoće završene pobačajem u prvom ili drugom trimestru.

Višeploidne trudnoće i ART

Najveći neželjeni efekat postupka predstavljaju višeploidne trudnoće (Pinborg i sar., 2004). Povećan perinatalni mortalitet, komplikacije majke i visoki medicinski troškovi

su prevelika cena koju plaćaju pojedinci, društvo i medicinska profesija.

Registri evropskih i američkih udruženja za reproduktivni medicinu, prema podacima iz 2004., godine ukazuju na visoku stopu multiplih trudnoća od 26.4% i 35.4% u odnosu na 1.2% blizanačkih trudnoća iz spontane koncepcije. (Nyboe-Andersen i sar., 2004). Znači, skoro polovina IVF dece pripada "setu" multiplih beba".

Glavni rizici po plod iz višeploidne trudnoće predstavljaju prematuritet i restrikcija rasta (Malone i sar., 1999). Prvi izveštaji o povećanoj učestalosti monozigotnih (MZ) blizanaca nakon postupka in vitro fertilizacije su objavljeni 1984 (Yovich i sar., 1984), i od tada mnogobrojne studije su demonstrirale ovo tvrđenje (Wright i sar., 2007; Edwards i sar.1986; Sills i sar., 2000; Alikani i sar., 2003). Učestalost MZ blizanaca spontano je 0.4 do 0.45% a u ART između dva i dvanaest puta veća (Blickstein i sar., 2003; Edwards i sar., 1986; Alikani i sar., 2003).

Pored komplikacija koje se javljaju kod dizigotnih blizanaca i dihorionskih momozigotnih, kod monohorionskih blizanaca se javljaju i dodatne komplikacije u vidu twin to twin transfusion sindroma (TTS) kao rezultata vaskularnih anastomoza posteljice i stepena zajedničkog krvotoka sa ucestalošću od 10 do 20%. Monohorionski monoamnionski blizanci nose čak još i veći rizik zbog incidenata sa obmotavanjima pupčanika (Dickinson i sar., 2005).

Mehanizmi nastanka MZ blizanaca i spontano su nerazjašnjeni. U procesima ART smatra se da vise faktora doprinosi nastanku i to majke sa vise od 35 godina (Alikani i sar., 2003), postupak ovarijalne stimulacije, manipulacije zonom pelucidom (ICSI, asistirane hatching) (Tarlatis i sar., 2002), efekti temperature medijuma, kao i transfer blastociste 5 dana, čak i bez manipulacije zone pelucide (Peramo i sar.,1999). Ne postoji kompletan konsenzus o evidentnom učešću ni jednog od ovih faktora, jer čitav niz studija iznosi podatke koji ne pokazuju njihovu ulogu i doprinos (Papanikolau i sar., 2006; Meldrum i sar., 1998; Yanaihara i sar., 2007).

Jednoplodne trudnoće i ART

Prematuritet u kontekstu jednoplodnih trudnoće nakon ART uz kraće trajanje trudnoće i manje telesne mase, je novi moment na koji su ukazale velike studije ART dece.

Noviji izveštaji ukazuju na lošiji perinatalni ishod dece rođene iz ART, ne samo iz gemelarnih trudnoća, već i jednoplodnih. (Jackson i sar., 2004), kao i povećanu

učestalost kongenitalnih malformacija, posebno kao rezultat ICSI postupka. Petnaest studija koji su obuhvatile 12283 IVF trudnoće jednoplodnih i 1.9 miliona spontano začetih, su pokazale veću učestalost perinatalnog mortaliteta, prevremenog porođaja, intrauterinog zastoja u rastu i veoma male telesne težine (manje od 1500 grama) (Jackson i sar.,2004), kao i kraće trajanje gestacije uz veću učestalost operativnog načina završavanja trudnoće (Nassar i sar., 2003).

Jednoplodne trudnoće nakon asistiranje reprodukcije imaju značajno lošiji perinatalni ishod u odnosu na spontane trudnoće, čak i u odnosu kada se gemelarne trudnoce nakon ART porede sa spontanim gemelarnima, odn perinatalni mortalitet je 40 % niži kod IVF gemelarnih trudnoća. (Helmerhorst i sar., 2004).

Rizik od pojave prematuriteta, intreuterinog zastoja u rastu, preeklapsije izgleda da je pored višeplođnih, gde je očekivano, povećan i kod jednoplodnih ART trudnoća (Katalinic i sar., 2004; Ludwig i sar., 2002; Helmerhorst i sar., 2004; Schieve i sar., 2004).

Prve indikacije da ART jednoplodne trudnoce takođe imaju lošiji perinatalni ishod pojavili su se 1985.godine (Austrian in vitro collaborative group, 1985), ali nerazjašnjeno kolika je uloga IVF a koliko konfauding faktora, kao sto su starost majke i paritet. Vise kohortnih macovanih studija je potvrdilo lošiji perinatalnih ishod jednoplodnih trudnoća (Dhont i sar., 1999; Tan i sar., 1992; Verlaenen i sar., 1995; Reubinoff i sar., 1997). Neke studije su pokazale suprotne tvrdnje (Dhont i sar., 1997; Isakkson i sar., 2002), dok je većina izvestila samo o razlikama (Minakami i sar., 1998; Fitzsimmons i sar., 1998).

Naime, postavlja se pitanje da li se u postupku asisitirane fertilizacije dobijaju embrioni slabog kvaliteta uz preskakanje prirodne selekcije kao mehanizma za eliminisanje manje kvalitetnih jedinki. Naime, direktnim spajanjem muške i ženske reproduktivne ćelije (ICSI) uz neminovno oštećenje zone pelucide i citoplazme, nosi sa sobom rizik od stvaranja lošijih embriona. Međutim, veštački kreiran embrion, ako uspešno prebrodi brojne traume u procesu asistiranje fertilizacije, kao i boravak u miljeu različitom od uterinog i jajovoda, i uspe da se implanitira potencijalno mora biti izdržljiviji od spontano nastalog. Ovako kreiran arteficialni ambijent, moze potencijalno da dovede do ekspresije skrivenih nedostataka embriona i nastanka kongenitalnih malformacija. Ali, druga strana problema se odnosi na činjenicu da infertilan muškarac ima

spermatozoide slabijeg kvaliteta, a žena verovatno slabije oocite i teško sposobne za spontanu prokreaciju. Egzogeni hormonski stimulacijski tretman je jedan od faktora odgovornih za slabiju kvalitetu oocita u ART, naime dobijamo ih u većem broju, ali nejasnog kvaliteta.

Kongenitalne malformacije i ART

Izveštaji o učestalosti kongenitalnih malformacija kod fetusa i dece nastalih ART su oprečni. Naime, prisustvo većine kongenitalnih malformacija poredjenjem nađeno je kod od 8.6% ICSI dece (301 dece), 9.0% IVF (837) i 4.2% kod spontano začete (4000 dece) (Hansen i sar., 2012).

Tri puta veću učestalost od pojave defekata neuralne cevi, alimentarnih atrezija, omfaklokele i hipospadije nakon ICSI u odnosu na spontano začete na uzorku od 9111 dece iz ART, navode Erricsson i Kallen, 2001., uz odsustvo razlike u pojavi hipospadije kod IVF bebe u odnosu na spontane, što se može objasniti vezano za uzroke paternalnog infertiliteta.

Ispitujući 1987 dece nakon ICSI, kod 46 živorođene su nađene većine kongenitalne malformacije, odn. incidenca 2.3%, dok su kod 4 od 7 mrtvorodjenih (Bonduelle et sar., 1999).

Čitav niz velikih studija, nije demonstrirao značajnu razliku u učestalosti kongenitalnih malformacija dece iz Art u odnosu na spontanu populaciju, kao ni između različitih metoda IVF i ICSI (Lie i sar., 2005). U pogledu kategorije kongenitalnih malformacija, rasta, opšteg zdravlja nisu nađene razlike u praćenju dece u periodima od 5 i 8 godina nakon rođenja nakon ICSI procedure u odnosu na jednoplodne nakon IVF i spontano začetih, uz nešto lošiji perinatalni ishod nakon ICSI procedure u odnosu na spontane (Knoester i sar., 2008).

Danska kohortna studija koja je obuhvatila 730 dece nakon ICSI opisuje 2.2% većine kongenitalnih malformacija kod živorođjenih, ako se uključe i mrtvorodjena 2.75 (Pinborg i sar., 2004). Većine kongenitalne malformacije (izazivaju oštećenje funkcije organa i-ili zahtevaju hirurške korekcije) su nađene na rođenju u 3.4% ICSI dece i 3.8% IVF dece (Bonduelle i sar., 2002).

Poremaćaji genskog imprintinga

Epigenetika obuhvata načine kontrole postojane i nasledne mehanizme ekspresije gena, koji ne menjaju primarnu DNK strukturu tj sekvencu nukleotida. Genomski imprinting je način epigenetičke regulacije, pri čemu se u jednoj ćeliji omogućava represija jednog od alela, dok je drugi u aktivnom stanju odnosno ekspresiji i ova alel specifična regulacije je zavisna od porekla alela (majčin ili očev). Većina diploidnih organizama poseduje po dve kopije svakog autozomnog gena, jednog od svakog roditelja, i većina ima simultanu ekspresiju od oba alela. Oko 40 gena u humanoj populaciji je podvrgnuto imprintingu. Smatra se da su procesi metilacije DNK i pakovanje sa histonima načini regulacije i održavanja imprintinga.

Većina imprintovanih gena je uključena u procese embrionalnog i placentnog rasta, i kod čoveka se navodi 10 sindroma u vezi sa poremećajima imprintinga (Beckwith-Wiedeman sindrom, BWS, u vezi sa imprintovanim genima na 11p15; Prader-Willi sindrom 15q11-q12; Angelman sindrom 15q11-q12; Silver-Russell sindrom (SRS) 7p11-p13, 7q31-qter; Tranzitorni neonatalni diabetes melitus 6q24; Maternalni i paternalni UPD14 sindromi hromozom 14; Familijarni nehromatofini paragangliom 11q13; Albright hereditarna osteodistrofija; MCCune-Albright sindrom 20q13) (Malvivalvirat i sar., 2009).

Mnogi imprintovani geni se nalaze u klasterima u okviru više domena i imaju uobičajene regulatorne mehanizme DMR (differentially methylated regions), gde se metilacije pojavljuje na CpG (citozin-fosfatid-guanin) regionima DNK, tipično na tihom alelu imprintovanog gena. Imprinting kontrolni regioni (ICR) regulišu klastere imprintovanih gena i oni različito obeležavaju roditeljske alele čineći ih nemim ili aktivnim. Zanimljivo je da većina ICR imaju obrazac metilacije od oocita, a samo 4 imprintovana klastera imaju ICR označen u ćelijskoj liniji od oca.

Obrasci imprintinga se u svakoj generaciji moraju obnavljati, zadržavaju se nakon fertilizacije i održavaju se sa svakom ćelijskom deobom do kraja života. Samo germinativne ćelije imaju sposobnost brisanja oznaka imprintinga tokom razvoja u embrionalnom životu.

Kod fetusa u primordijalnim germinativnim ćelijama dolazi do brisanja imprintinga i uspostavljanja novog zavisno od pola. Uspostavljanje maternalnih imprintinga se

postiže sve do neposredno pred ovulaciju, što čini proces vulnerabilnim na stimulaciju ovulacije i aspiraciju folikula u ART. Paternalni imprinting se uspostavlja kod muškog fetusa rano u spermatogenezi u epididimisu, već na nivou diploidnih okruglih spermatogonija i teško da ima osnova da ART može poremetiti proces (Allegrucci i sar., 2005; Hartman i sar., 2006).

Nakon fertilizacije postoji sekundarni vulnerabilni period u ART jer tada dolazi do talasa opšte demetilacije neimprintovanih gena uz održavanje obrazaca imprintovanih. Smatra se da uticaju u ovom periodu u vidu izlaganje embriona uslovima kulture medijuma in vitro i raznih invazivnih procedura (PGD, krioprezervacija) mogu poremetiti funkciju imprintovanih gena (Owen, Segars, 2009). Većina saznanja o modelima imprintinga su sa populacije miševa, zbog nedovoljnih količina materijala i mnogobrojnih etičkih ograničenja.

Najviše dokaza o vezi poremećaja imprintinga i bolesti navodi poremećaj metilacionog statusa maternalnog alela. Zatim, izveštaji navode i veću vulnerabilnost maternalnog genoma na defekte metilacije i održavanje imprintinga za vreme preimplantacionog razvoja prilikom izloženosti embriona in vitro kulturi medijuma. (Jacob, Moley, 2005)

Međutim, početkom 2002. godine primećena je češća pojava retkih genskih sindroma nakon ART Beckwit Wiedemann, (BWS) Angelmann sindroma, kao i embrionalnog tumora retinoblastoma, koji se pripisuju problemu imprintinga gena i tako otvorili novo poglavlje u razumevanju multifaktorijelne etiologije kongenitalnih malformacija uopšte, kao i epigenetike i imprintinga (Gosden i sar., 2003).

Beckwith-Wiedeman sindrom (BWS) je redak poremećaj sa incidencom 1/13700 živorođenja i odlikuje se sindromom kongenitalnog prekomernog rasta sa makroglosijom, defektima prednjeg abdominalnog zida, makrozomijom, neonatalnom hipoglikemijom i čitavim nizom razvojnih anomalija. Deca sa BWS imaju povećan rizik od razvoja embrionalnih tumora kao što su Wilmsov, rabdomiosarkom i hepatoblastom. (Eliot i sar. 1994; Junien, 1992). BWS sindrom se pripisuje mutaciji ili epigenetkom događaju koji uključuje dva imprinting kontrolna regiona 11p15.5 i dovodi do gubitka metilacije. Naime, ispitivanje pacijenata nakon ART sa BWS pokazano da pojava ne zavisi od metode ART, kao i da fenotipska prezentacija sindroma je različita od spontano nastalih. Naime više od 90% dece sa BWS nakon ART je imalo defekte imprintinga u poredjenju sa 40-50% spontano začetih (Malvivalviratn i sar., 2009).

Gubitak metilacije maternalnog alela se javlja kod 37.5% ART dece i 6.4% non-ART, i generalno hipometilacija je češća kod BWS sindroma ART dece, ali nije ekskluzivni poremećaj ove grupacije (Lim i sar., 2009).

Angelmanov sindrom sa incidencom 1/15000 živorođenja se karakteriše mentalnom retardacijom, epileptičkim napadima, dismorfničnim pojavama lica, često bezrazložnim smehom. Molekularna osnova sindroma je deficijencija ekspresije maternalnog gena UBE3A koji se nalazi u imprintning klasteru na hromozomu 15q11-15q13 u mozgu. Gubitak maternalne ekspresije gena može biti rezultat delecije i mutacije, paternalne uniparenteralne dizomije ili imprinting defekta maternalnih alela (Williams i sar., 2007; Clayton-Smith i sar., 2003). Prva publikacije koja je ukazala na vezu ART (ICSI) i Angelmanovog sindroma je izvestila o dvoje dece rođene nakon tretmana muškog infertiliteta sa nađenom značajnom hipometilacijom (Cox i sar., 2002). Do danas je objavljeno 7 slučajeva Anglemanovog sindroma nakon IVF/ICSI tehnologije i kod 5 se nalazi defekt imprintinga. Kod više od 50% dece rođene sa Angelmanovim sindromom nakon ART nađen je imprinting defekt u gubitku metilacije maternalnog alela (Lim i sar., 2009).

U slučaju retinoblastoma, za sada imamo samo jednu veću studiju o učestalosti iz Holandije gde je opisano 5 slučajeva kod dece iz ART gde se razvio retinoblastom, čija je učestalost 1/17000 živorođenja (Moll i sar., 2003). Mutacija jednog od alela tumor supresorskog gena RB1 u kombinaciji sa gubitkom hromozoma ili delecijom drugog alela najčešći je naalaz kod retinoblastoma.

Apsolutna incidenca bolesti poremećaja imprintinga je veoma mala, manja od 1:12000 rodjenja, rutinski skrining kod dece iz Art se ne preporučuje, kao i veza ART i ovih bolesti nije dovoljno istražena (Malipalviratn i sar., 2009).

U zavisnosti od uticaja in vitro medijuma i kulture, kao i vrste tehnike fertilizacije, očekivano je da i sam faktor infertiliteta ima uticaja na incidencu pojave kongenitalnih malformacija i grešaka imprintinga. Isti ili sličan uzrok infertiliteta može izazvati problem postizanja trudnoće ili rezultovati povećanim rizikom pojave major kongenitalnih malfromacija. Naime, veća učestalost ekstrauterinog graviditeta, heterotopičnog graviditeta i kliničkih abortusa nakon ART pokazalo je dosta studija (Ludwig i sar., 2002).

CILJEVI RADA

Prvi osnovni cilj je dokazati da se jednoplodne trudnoće nastale metodom asistiranе reprodukcije razlikuju od spontano začętih po toku i ishodu.

1. Da se jednoplodne trudnoće nastale metodama asistiranе reprodukcije razlikuju od spontano začętih po toku trudnoće.
2. Da se jednoplodne trudnoće nastale metodama asistiranе reprodukcije razlikuju po dužini trajanja trudnoće od spontano začętih
3. Da se jednoplodne trudnoće nastale metodama asistiranе reprodukcije razlikuju po načinu završavanja trudnoće od spontano začętih
4. Da se jednoplodne trudnoće nastale metodama asistiranе reprodukcije razlikuju po neonatalnom ishodu od spontano začętih
5. Da se jednoplodne trudnoće nastale metodama asistiranе reprodukcije razlikuju po učestalosti kongenitalnih malformacija i hromozomopatija od spontano začętih

Drugi cilj je dokazati da se blizanačke trudnoće nastale metodom asistiranе reprodukcije razlikuju od spontano začętih po toku i ishodu.

1. Da se blizanačke trudnoće nastale metodama asistiranе reprodukcije razlikuju od spontano začętih po toku trudnoće.
2. Da se blizanačke trudnoće nastale metodama asistiranе reprodukcije razlikuju po dužini trajanja trudnoće od spontano začętih
3. Da se blizanačke trudnoće nastale metodama asistiranе reprodukcije razlikuju po načinu završavanja trudnoće od spontano začętih
4. Da se blizanačke trudnoće nastale metodama asistiranе reprodukcije razlikuju po neonatalnom ishodu od spontano začętih
5. Da se blizanačke trudnoće nastale metodama asistiranе reprodukcije razlikuju po učestalosti kongenitalnih malformacija i hromozomopatija od spontano začętih

Treći osnovni cilj je pokazati da se jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistiranе reprodukcije (IVF, ICSI) razlikuju međusobno u zavisnosti od vrste primenjene metode:

1. Da se jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije razlikuju međusobno po toku trudnoće zavisno od vrste metode.
2. Da se jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije razlikuju međusobno po dužini trajanja trudnoće zavisno od metode
3. Da se jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije razlikuju međusobno po načini završavanja trudnoće zavisno od vrste metode
4. Da se jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije razlikuju međusobno po neonatalnom ishodu zavisno od vrste metode
5. Da se jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije razlikuju međusobno po učestalosti pojave kongenitalnih malformacija i hormozomopatija zavisno od vrste metode koncepcije

Četvrti osnovni cilj je pokazati da se blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije (IVF, ICSI) razlikuju međusobno u zavisnosti od vrste primenjene metode

1. Da se blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije razlikuju međusobno po toku trudnoće zavisno od vrste metode.
2. Da se blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije razlikuju međusobno po dužini trajanja trudnoće zavisno od metode
3. Da se blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije razlikuju međusobno po načini završavanja trudnoće zavisno od vrste metode
4. Da se blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije razlikuju međusobno po neonatalnom ishodu zavisno od vrste metode
5. Da se blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije razlikuju međusobno po učestalosti pojave kongenitalnih malformacija i hormozomopatija zavisno od vrste metode koncepcije

HIPOTEZE

I. Jednoplodne trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih.

Specifične hipoteze

1. Jednoplodne trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih po toku trudnoće
2. Jednoplodne trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih po dužini trajanja trudnoće
3. Jednoplodne trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih po načinu završavanja trudnoće
4. Jednoplodne trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih po neonatalnom ishodu trudnoće
5. Postoji razlika u učestalosti kongenitalnih malformacija i hromozomopatija u jednoplodnim trudnoćama nakon asistirane reprodukcije i spontano nastalih

II. Trudnoće blizanačke nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih.

Specifične hipoteze

1. Blizanačke trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih po toku trudnoće
2. Blizanačke trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih po dužini trajanja trudnoće
3. Blizanačke trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih po načinu završavanja trudnoće
4. Blizanačke trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih po neonatalnom ishodu trudnoće
5. Postoji razlika u učestalosti kongenitalnih malformacija i hromozomopatija u blizanačkim trudnoćama nakon asistirane reprodukcije i spontano nastalih

III. Jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije (IVF, ICSI) se razlikuju međusobno u zavisnosti od vrste metode

Specifične hipoteze

1. Jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije se razlikuju međusobno u pogledu toka trudnoće zavisno od vrste metode koncepcije
2. Trudnoće jednoplodne nastale različitim metodama asistirane reprodukcije se razlikuju međusobno u trajanju trudnoće zavisno od vrste metode
3. Jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije se razlikuju međusobno u načini završavanja trudnoće zavisno od vrste metode
4. Jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije se razlikuju međusobno po neonatalnom ishodu trudnoće zavisno od vrste metode
5. Trudnoće jednoplodne nastale različitim metodama asistirane reprodukcije se razlikuju međusobno u učestalosti pojave kongenitalnih malformacija i hromozomopatija zavisno od vrste metode

IV. Blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije (IVF, ICSI) se razlikuju međusobno u zavisnosti od vrste metode

Specifične hipoteze:

1. Trudnoće blizanačke nastale različitim metodama asistirane reprodukcije se razlikuju međusobno u pogledu toka trudnoće zavisno od vrste metode koncepcije
2. Blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije se razlikuju međusobno u trajanju trudnoće zavisno od vrste metode
3. Blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije se razlikuju međusobno u načini završavanja trudnoće zavisno od vrste metode
4. Blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije se razlikuju međusobno po neonatalnom ishodu trudnoće zavisno od vrste metode
5. Blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistirane reprodukcije se razlikuju međusobno u učestalosti pojave kongenitalnih malformacija i hromozomopatija zavisno od vrste metode

KLINIČKI MATERIJAL I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA

Ispitivanjem, delom retrospektivnim, delom prospektivnim je obuhvaceno 1441 (881 jednoplodnih i 560 blizanačkih) trudnica porodilja na KGA KCS u periodu od 01.01.2001. do 31.12.2011., čije su trudnoće nastale nekom od metoda asistirane fertilizacije (IVF, ICSI), kao i 1441 trudnica (881 jednoplodna i 560 blizanačkih) koje su nakon spontane koncepcije porođene na IGA KCS u istom periodu.

Uslovi za uključivanje u studiju obuhvataju trudnoću (jednoplodnu, blizanačku) završenu porođajem nakon punih 24. gestacijskih nedelja, sa starosti majke do 45 godina, bez prisustva težih sistemskih bolesti (kardiovaskularnog, respiratornog, neurološkog, hematološkog sistema, bez malignih tumora i transplantiranih organa), postupak asistirane fertilizacije (IVF i ICSI).

Pod postupkom asistirane fertilizacije se podrazumevaju samo sveži ciklusi sa IVF i ICSI metodom sa embriotransferom, bez ciklusa koji uključuju donaciju oocita, donaciju embriona ili embriotransfere nakon postupka krioprezervacije embriona ili gameta.

Uzorak sačinjavaju dve grupe tj. studijsku grupu 1441 trudnice sa trudnoćama nastalim postupkom IVF i ICSI sa embriotransferom, a u kontrolnoj grupi trudnice odgovarajuće životne dobi, obrazovanja, pariteta, trudnoće sa brojem plodova (jedan, dva), porođene na KGA KCS u toku istog meseca odgovarajućeg perioda. Svako pojedinačnoj trudnici u studijskoj grupi je dodeljena pojedinačna kontrola odgovarajućih parametara.

Za posmatrani vremenski period na KGA KCS je porođeno 60 trudnoća sa trojkama i 1 trudnoća sa četvorkama. Naime, od 60 trudnoća sa trojkama, 41 je nastala postupkom ART, kao i trudnoća sa četvorkama, a od 19 preostalih trudnoća sa trojkama 9 je nastalo ili postupkom stimulacije ovulacije ili intrauterinom inseminacijom. S obzirom na koncipiranost istraživanja, nalazimo da ovim trudnoćama nakon ART ne bi mogli da dodelimo odgovarajuće kontrole spontano začete, pa u ovom istraživanju neće biti uzete u razmatranje.

Is istraživanja je isključeno 26 trudnica sa jednoplodnim trudnoćama nakon ART i 9 trudnica sa blizanačkim trudnoćama nakon ART zbog toga što je u pitanju ART sa

donacijom oocita, nakon krioprezervacije, nekompletnih podataka o infertilitetu ili samom postupku ART.

Prisustvo postupka stimulacije ovulacije ili/i intrauterine inseminacije je isključivalo definiciju spontano začete trudnoće i ovakvi slučajevi nisu uzimani u obzir kao kontrole.

Prikupljanje podataka

Podaci o trudnicama su prikupljeni uvidom u kompletne medicinske protokole (protokoli porođenih, protokoli carskih rezova, protokoli asistirane reprodukcije, neonatalni protokoli), uvidom u istorije bolesti i medicinsku dokumentaciju trudnica, kao i istorije bolesti neonatusa.

Podaci o infertilitetu, kao i ART postupku su dobijeni iz protokola asistirane fertilizacije i istorija bolesti KGA KCS, a za one pacijentkinje koje su postupak asistirane fertilizacije radile u drugim centrima popunjavanjem upitnika od strane istraživača na osnovu podataka dobijenim usmeno od strane pacijenta i uvidom u medicinsku dokumentaciju.

Faktori infertiliteta koji su bili indikacija za postupak ART su kategorije ovarijalni, tubarni, muški, uterini, endometrioza, cervikalni, nepoznati, imunološki i kombinovani (kombinacija muškog i nekog od ženskih faktora).

Postupak ART je podrazumevao etape kontrolisane ovarijalne stimulacije pri čemu su upotrebljeni sledeći protokoli i to dugi ili kratki „Flare up“ protokol sa GnRh agonistima uz primenu gonadotropina rFSH ili HP HMG pojedinačno ili u kombinaciji., zatim protokol sa GnRh antagonistima sa početkom primene od 6. do 8. dana stimulacije i gonadotropinima tj. rFSH, HP-HMG i protokol sa upotrebom klomifen-citrata, gonadotropina i GnRh antagonista., zavisno od indikacija.

Uslovi za primenu hCG su podrazumevali da je najmanje polovina dominantnih folikula dostigla 18mm prosečno, i primenjivan je u dozi od 10.000Ij/ml intramuskularno prečišćeni urinarni derivat i nakon 34-36 sati je rađena intervencija punkcije folikula i aspiracije oocita.

Transvaginalna punkcija folikula i aspiracija oocita je rađena u kratkotrajnoj intavenskoj anesteziji, pod kontrolom UZ, transvaginalnim putem sistemima sa aspiracionim

umpama. U laboratoriji nakon određivanja broja ćelija, na osnovu odluke embriologa je rađena ili klasična metoda in vitro fertilizacije IVF ili metoda ICSI. U slučaju kada je rađena kombinacija obe metode, pacijetkinja je dodeljena ICSI metodi.

IVF i ICSI kao načini in vitro fertilizacije su rađeni na uobičajen način (opisano u tekstu ranije). IVF u roku od 4 sata od aspiracije, a ICSI nakon denudacije

Kontrola fertilizacije je vršena u slučaju IVF 20 sati nakon klasične inseminacije, a 16 do 18 sati nakon ICSI metode odnosno kao potvrda fertilizacije je smatran stadijum dva pronukleusa (2PN).

Klasifikacija embriona je vršena na osnovu morfoloških parametara na klase A, B, C, D prema veličini, obliku i pravilnosti blastomera, prisustvu fragmentacija, kao i vremena brzine deobe. Parametri kvaliteta embriona su uključivali broj blastomera (0, 1, 2, 3, 4, ... i kompakciju), kao i stepen fragmentacije (0, ≤ 10 , 11-20, 21-50, $>50\%$ fragmentacija ili totalnu fragmentaciju- ne prepoznaju se blastomere), lokalizaciju fragmenata (lokalno ili disperzovano), zatim uniformnost blastomera (jednake ili nejednake tj kada je najveća blastomera za 25% u proseku veća u odnosu na najmanju blastomeru), prisutne znakove multinukleacija, kao i izgled citoplazme (homogen, tamna, granulirana, vakuolizirana). Embrioni A klase su oni koji drugog dana imaju 4 ili 5 blastomera, a 3 dana sedam i više, ujednačenih veličina i manje od 20% fragmentacija 3 dana bez multinukleacija.

Embriotransfer je vršen 2. ili 3. dana nakon aspiracije oocita sa maksimalno vraćena 3 embriona klase A ili B.

Lutealna suplementacije je vršena sa 600 mg mikronizovanog progesterona za vaginalnu primenu od dana aspiracije do kraja trudnoće ili sa 250mcg progesterona za intramuskularnu primenu na drugi dan.

Potvrda trudnoće je vršena za 14 dana nalazom betaHCG iz krvi, sa pozitivnom vrednošću se računa više od 50Ij/ml, a klinička potvrda trudnoće za 28 dana ultrasonografskim pregledom sa prisustvom gestacijskog meška sa plodom i evidentnom srčanom radnjom.

Gestacijska starost trudnoće kod ART trudnoća je određivana kao vremenski interval između embriotransfera minus 14 dana i dana porođaja, a za spontane koncepcije na osnovu dana poslednje menstruacije ili datiranjem na osnovu ultrasonografskog skena u

I trimestru.

Trudnice su u toku trudnoće ambulantno kontrolisane i po potrebi hospitalizovane. Vršeni se redovni ultrasonografski pregledi pri čemu je konstatovana vijabilnost ploda, morfološki anatomski pregled, dinamika rasta, lokalizacija i gradus placente, količina plodove vode, biometrijski parametri.

Trudnoće su praćene klinički, laboratorisjki i ultrasonografski

- Laboratorijski-kompletna krvna slika, urin, osnovne biohemijske analize, test oralnog opterećenja glukozom sa 75 ili 100 mg glukoze (OGTT), pregledi vaginalnog sekreta, kao i bakteriološki cervikalni i vaginalni brisevi, testovi na infektivne agense
- Klinički-kroz bimanuelne periodične ginekološke preglede, merenje vrednosti arterijske tenzije, merenje telesne mase
- Ultrasonografski- ultrasonografskim pregledima rutinski jednom mesečno, a sa indikacijama i češće.

Fetalna ehokardiografija je savetovana trudnicama sa opterećenom anamnezom, nađenim markerima i abnormalnostima ultrasonografski, kao frekvencijom ploda ispod 120 i iznad 160 otkucaja u minuti. Prvi pregled se standardno obavlja oko 18 nedelje gestacije, a kontrolni u roku od 4 do 6 nedelja.

Rutinsko ispitivanje uteroplacentarne i fetalne cirkulacije Dopplerom, ako i određivanje biofizičkog profila je rađeno prema indikacijama.

U sklopu maternalnih komplikacija smo uzimali PIH (pregnancy induced hypertension), PE preeklapsiju, eklapsiju, gestacijski diabetes melitus (GDM), prisustvo placente previje, abrupciju placente, PPRM prevremenu preterminsku rupturu plodovih ovojaka, PROM (prevremenu rupturu plodovih ovojaka), potrebu za aplikacijom serklaža.

Fetalna patologija je uključivala FMU (foetus mortus in utero) odnosno uginuće ploda u materici, hromozomopatije, prisustvo kongenitalnih anomalija, poremećaje u rastu ploda u vidu IUGR (intrauterine growth restriction) ili makrozomija ploda., koji su poređeni između ekperimentalna i kontrolne grupe.

Niska porođajna težina (LBW) se definiše kao težina ispod 2500 grama i veoma niska porođajna težina (VLBW) kao težina ispod 1500 grama.

Invazivna prernatalna dijagnostika je rađena prema standardnim indikacijama odnosno

nezadovoljavajući nalaz skrining testova, prisutvo sonografskih markera suspektno na hromozomopatije, opterećena porodična anamneza, godine majke i na lični zahtev para. Primena određene metode invazivnog skrininga zavisi od više faktora, između ostalog i gestacijske starosti trudnoće. Biopsija horionskih čupica (CVS) se može primeniti već u I trimestru, dok su genetska amniocenteza (RAC) i kordocenteza (CC) dostupne tek od II trimestra.

Trudnicama sa dijagnostikovanim hromozomopatijama ploda, kao i kongenitalnim malformacijama nespojivim sa postnatalnim životom, predloženo je stanje ploda i moguće implikacije na kvalitet postnatalnog života, a roditelji su sami odlučivali o daljoj sudbini trudnoće.

Komplikacije tokom porođaja, način završavanja trudnoće, gestacijska starost, porođajna težina, ocena po Apgaru, prezentacija ploda, pol, Apgar skor u 1. i 5. minutu, su poređeni između grupa.

Parametri neonatalnog ishoda predstavljaju i učestalost prijema u Intenzivnu neonatalnu negu (NICU), kao i dužina boravka, neonatalne komplikacije (RDS, sepsa, , intrakranijalna hemoragija gr III i IV, infekcije, konvulzije), potreba za operativnim lečenjem, dužina hospitalizacije, perinatalni i neonatalni mortalitet.

Kod trudnica, kod kojih je trudnoću, najčešće zbog intrauterine patnje ploda, bilo potrebno jatrogeno ranije završavati, rađena je amniocenteza u III trimestru radi određivanja L/S odnosa i broja ćelija. Ako L/S odnos nije bio zadovoljavajući, vršena je arteficialnaa maturacija fetalnih pluća aplikovanjem po 6mg kortikosterioda na 12 sati u 4 doze transplacentarno prema kliničkom protokolu.

Statistička analiza

Statistička analiza podataka je urađena upotrebom IBM SSPS (statistical Packages for Social Sciences) verzija 20.0 za Windows. Analize su urađene posebno za jednoplodne i blizanačke trudnoće.

Podaci su prikazani sa srednjom vrednošću i standardnom varijacijom $X \pm SD$ za kontinualne varijable i kao procenti i promili za kategoričke. Normalnost distribucije kontinualnih varijabli je određivana Shapiro Wilks testom.

Za poređenja između grupa koristili smo Studentov T test (parametarski podaci) i Mann Whithney U test (neparametarski podaci) za kontinuirane varijable i Pirsonov χ^2 test sa

Yates korekcijom i Fisherov test z za kategoričke varijable.

Relativni rizik RR je računat poređenjem incidence različitih kategorija između grupa sa 95% intervala poverenja i sa upotrebom dvosmerne p vrednosti sa SAS statističkim softverom, verzijom 9.2.

Vrednost verovatnoće p manja od 0.05 je smatrana kao statistički značajna.

REZULTATI

Prvo su izloženi rezultati za jednoplodne trudnoće, a zatim za blizanačke.

Trudnicama sa jednoplodnim trudnoćama nakon ART 881 su odabrane 881 kontrola sa spontanim trudnoćama odgovarajuće starosti, školske spreme i pariteta (tabela br. 1). Svakoj pojedinačnoj ženi sa jednoplodnom trudnoćom odabrana kontrola jednake starosti, školske spreme, pariteta, mesta porođaja i vremena porođaja (u okviru istog meseca).

Tabela br. 1. Opšte karakteristike uzorka.

Karakteristika		Jednoplodne ART		Jednoplodne kontrola		Značajnost razlika
		Broj	%	Broj	%	
Starost, (Xsr±sd)		35.70±4.28		35.57±4.18		p=0.510
Školska sprema	Niska	121	13.7	126	14.3	p=0.908
	Srednja	356	40.41	359	40.7	
	Visoka	404	45.9	396	44.99	

Prosečna starost žena sa jednoplodnim trudnoćama u ART grupi je 35.70±4.28 godina, a kod kontrola 35.57±4.18, sa medijanom vrednosti 36.00 godina odnosno rasponom od 20.00 do 45.00 godina (t=0.659, DF=1760, p=0.510).

Najveći broj žena je u kategoriji od 35 do 39 godina (44.3% vs. 46.1%), a najmanje su zastupljene žene od 40 do 45 godina (19.2% vs 16.9%), što prikazuje Tabela br 2. Nema značajne razlike u dobnoj distribuciji ispitanica između grupa ($\chi^2=1.604$, df=2, p=0.448).

Tabela br 2. Distribucija žena prema godinama starosti

			Dobne grupe			Ukupno
			< 35 g.	35-39 g.	40 g i više	
Grupa	Jednoplodne ART	N	322	390	169	881
		%	36.5%	44.3%	19.2%	100.0%
	Jednoplodne kontrole	N	326	406	149	881
		%	37.0%	46.1%	16.9%	100.0%
Ukupno		N	648	796	318	1762
		%	36.8%	45.2%	18.0%	100.0%

Više ili visoko obrazovanje poseduje oko polovina žena odnosno kod 404 (45.9%) žena u ART grupi prema 396 (44.9%) kod kontrola, a najniže osnovno obrazovanje samo kod 121 (13.7%), odnosno 126 (14.3%) ($\chi^2=0.194$, $df=2$, $p=0.908$).

Bez porođaja u anamnezi je najveći broj žena sa jednoplodnim trudnoćama nezavisno od načina nastanka trudnoće tj 835 (94.8%) kod ART i 826 (93.8%) kod spontanijih, dok su dva porođaja zabeležena kod 3 žene (0.3%) prema 1 (0.1%) ($\chi^2=2.296$; $df=2$, $p=0.317$) (Tabela br. 3).

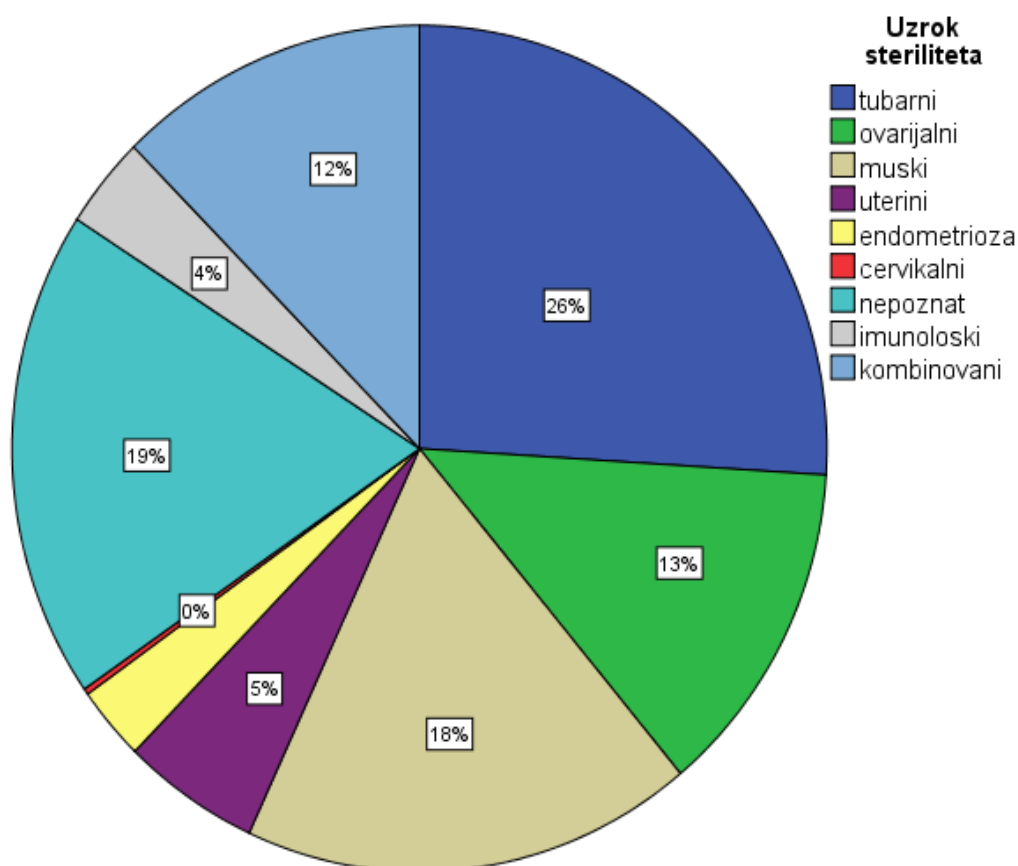
Tabela br 3. Akušerska anamneza

Karakteristika		Jednoplodne ART		Jednoplodne kontrola		Značajnost razlika
		Broj	%	Broj	%	
Graviditet	0	713	80.9	760	86.3	Z=3.251 p=0.001
	1	116	13.2	100	11.3	
	2	35	4.0	17	1.9	
	≥3	17	1.9	4	0.4	
Paritet	0	835	94.8	826	93.8	p=0.317
	1	43	4.9	54	6.1	
	2	3	0.3	1	0.1	
Broj spontanijih abortusa	0	794	90.1	831	94.3	Z=3.255 p=0.001
	1	58	6.6	28	3.2	
	2	15	1.7	16	1.8	
	≥3	14	1.5	6	0.7	
Ektopični graviditet	0	830	94.2	878	99.7	$\chi^2=44.206$ p=0.0001
	1	39	4.4	3	0.3	
	2	12	1.4	0	0	

Međutim po graviditetu odnosno broju dosadašnjih trudnoća primećujemo razliku u grupama. Naime, veći broj žena u ART grupi je već imao neku vrstu trudnoće u anamnezi (uspešni ili neuspešnu) odnosno 19.1%, dok kod kontrola je to 13.7% što razliku čini statistički visoko značajnom ($U=365747.500$; $z=-3.251$, $p=0.001$). Prisustvo trudnoće u anamnezi infertiliteta čini klasifikaciju infertiliteta kao sekundarnog. Od toga broja najviše njih ima po već jednu trudnoću u anamnezi 13.2% kod ART prema 11.3% kod kontrola. U grupi gde je infertilitet problem očekivano je veći rizik prisustva spontanog pobačaja 9.9% prema 5.6% ($U=371947$; $Z=-3.255$; $p=0.001$) i vanmateričnih trudnoća 5.8% vs 0.3% ($\chi^2=44.206$, $df=2$; $p=0.0001$). Dvostruki ektopični graviditet je zabeležen kod 12 žena (1.4%) u ART grupi, dok kod spontanijih jednoplodnih trudnoća to ne nalazimo. Ova razlika je posledica samog uzroka infertiliteta jer je očekivano da u grupi žena koje su trudnoću ostvarile ART ima veći procenat neuspešne reprodukcije u

vidu spontanih pobačaja i vanmateričnih trudnoća, pa je zato bilo potrebe za ART.

Najčešći uzrok steriliteta kod jednoplodnih trudnoća je tubarni faktor sa 26%, zatim slede skoro izjednačeni nepoznati sa 18.7% i muški sa 17.9% i ovarijalni sa 12.9%. Kombinovani uzrok infertiliteta je zabeležen u 12.4%. Ženski faktor infertiliteta zauzima 51.0%, sa 26% tubarnog, 12.9% ovarijalnog, 5.4% uterini, 3.5% imunološki, 2.8% endometrioze (Grafikon br.1).



Grafikon br 1. Uzrok steriliteta

Tabela br 4. Vrsta metode vantelesne oplodnje

	N	%
IVF	455	51.6
procedura ICSI	426	48.4
Total	881	100.0

Nešto više od polovine procedura (51.6%) ART je urađeno klasičnom metodom IVF, a skoro isti skor beleži i ICSI metoda 48.4%, što ih praktično čini ravnopravnim u uzorku, bez značajne razlike (Tabela br 4). Pri posmatranju broja jednoplodnih trudnoća 455 je postignuto IVF, a manje 426 ICSI, što govori o praktično ravnopravnom korišćenju metode in vitro fertilizacije, ali i približnoj uspešnosti.

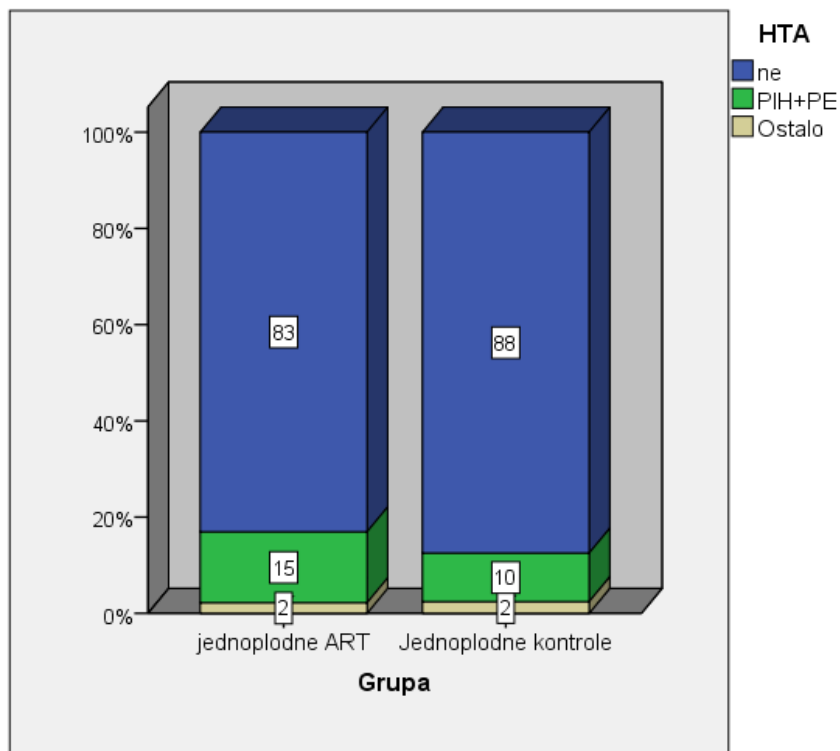
Komplikacije u trudnoći su prikazane u tabeli 5. Kao komplikacije smo obuhvatili kategorije hipertenzivni poremećaje PIH (pregnancy induced hypertension), PE (preeklampsija), eklampsiju, Hellp Sindrom, nefrotski sindrom, hroničnu hipertenziju), zatim gestacijski dijabetes melitus (GDM), centralnu placentu previju, abrupciju placente i PPROM (preterm premature rupture of membranes; prevremena preterminska ruptura plodovih ovojaka) i PROM (premature rupture of membranes).

Tabela br 5. Maternalne komplikacije u jednoplodnoj trudnoći

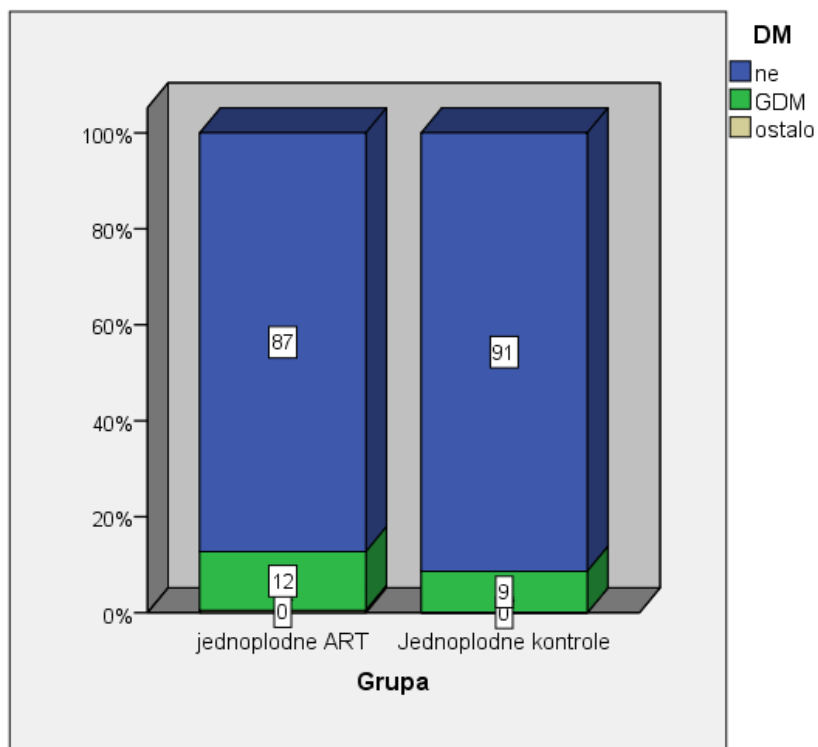
Karakteristika		Jednoplodne ART		Jednoplodne kontrola		Značajnost razlika
		Broj	%	Broj	%	
Hipertenzivni poremećaj	PIH	113	12.8	79	9	$\chi^2=6.637$ p=0.01
	PE	17	1.9	10	1.1	p=0.282
	ukupno	130	14.8	89	10.1	$\chi^2=8.788$ p=0.01
GDM	A1	104	11.8	71	8.1	$\chi^2=10.389$ p=0.006
	A2	4	0.5	5	0.6	
	ukupno	108	12.3	76	8.6	
Placenta previja centralna		2	0.2	0	0	p=0.367
Abrupcija placente		3	0.3	1	0.1	p=0.367
PPROM (gestacijska starost)	≤32	3	4.1	6	11.5	p=0.137
	32.0-36.9	29	39.7	14	26.9	$\chi^2=5.363$ p=0.02
	Ukupno <37	31	43.8	20	38.4	$\chi^2=6.317$ p=0.0001
PROM	≥37	41	56.2	32	61.5	p=0.167
serklaž		28	3.2	7	0.8	$\chi^2=12.855$ p=0.0001
invazivna dijagnostika		510	57.9	416	47.2	$\chi^2=20.111$ p=0.0001

Kod 113 (12.8%) žena je imalo hipertenziju u trudnoći u odnosu na 79 (9.0%) kod kontrola, što razliku čini statistički značajnom ($\chi^2=10.625$, df=5, p=0.05). Ako se posmatra učestalost hipertenzivnih poremećaja u trudnoći zajedno PIH i preeklampsije, koji su najčešći, veći rizik pojave oboljenja imaju trudnice u IVF grupi ($\chi^2=8.788$, df=2,

p=0.012), i to veoma značajno (grafikon br 2).



Grafikon br 2. Hipertenzivni poremećaji u trudnoći



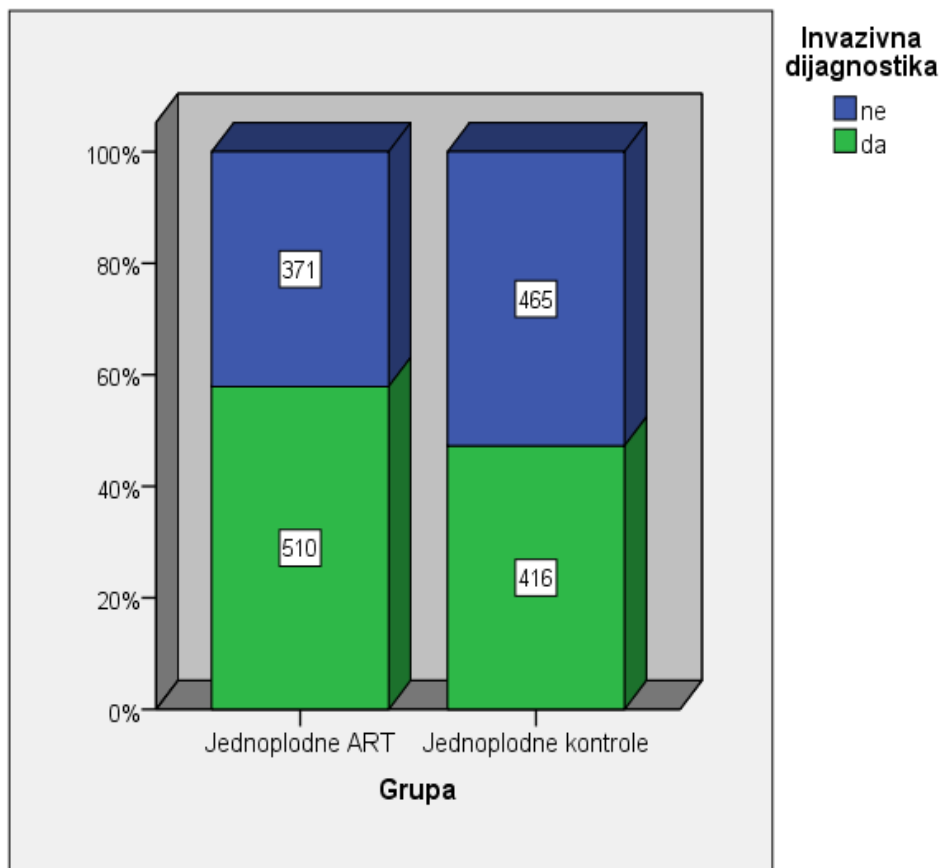
Grafikon br 3. Gestacijski diabetes u trudnoći

Kod 108 žena (12.3%) u ART grupi je postavljena dijagnoza gestacijskog dijabetesa (GDM) sa testom uz upotrebu OGTT (oral glucose tolerance test), dok je samo kod 76 (8.6%) u slučaju spontano začetih trudnoća evidentiran ($\chi^2=10.389$, $df=2$, $p=0.006$), što je statistički visoko značajno (grafikon br 3).

Prisustvo centralne placente previje i abrupcije placente je komparabilno između grupa i zabeleženo sa niskom učestalošću. Preвременa ruptura plodovih ovojaka (PROM) ako se desila u terminu PROM odnosno nakon 37 nedelje, a pre započinjanja regularnih materičnih kontrakcija, beleži sličnu učestalost u obe grupe, nezavisno od načina nastanka trudnoće. Međutim, ako se preвременa ruptura plodovih ovojaka desila pre 37 nedelje gestacije, veći rizik je da do nje dođe u trudnoći nakon ART ($\chi^2=6.317$, $df=2$, $p=0.042$). Ako pogledamo detaljnije, ako se preвременa pretermimska ruptura plodovih ovojaka desila u periodu od 32 do 37 nedelje gestacije, verovatnije je da je u pitanju trudnoća posle ART ($\chi^2=5.363$, $df=2$, $p=0.02$). U grupi sa PPRM ispod 32 nedelje gestacije nalazimo veći broj trudnica u kontrolnoj grupi, ali rezultat zbog male frekvencije događaja i visoke varijabilnosti pored značajnosti razlike, nije reprezentativan za zaključivanje jer je verovatno posledica slučajnosti.

Antenatalni nadzor ART trudnoća je mnogo obazriviji nego kada su one spontano nastale i serklaž je češće aplikovan kod ovih trudnica 28 (3.2%) nego kod spontano začetih 7 (0.8%), što razliku čini statistički visoko značajnom. ($\chi^2=12.855$; $df=1$, $p=0.0001$).

Prenatalna invazivna dijagnostika je mnogo češće savetovana u trudnoćama nakon ART i to u 57.9%, dok je u kontrolnoj grupi urađena u 47.2%, što je statistički visoko značajna razlika ($\chi^2=20.111$, $df=1$, $p=0.001$). Najviše korišćena metoda prenatalne invazivne dijagnostike je urađena genetska amniocenteza 42.2% u ART grupi prema 39.7% kod kontrola, dok u tri slučaja u ART grupi su rađene kombinacija amniocenteze i kordocenteze, kao i biopsije horionskih čupica i kordocenteze radi provere rezultata (Grafikon br 4).



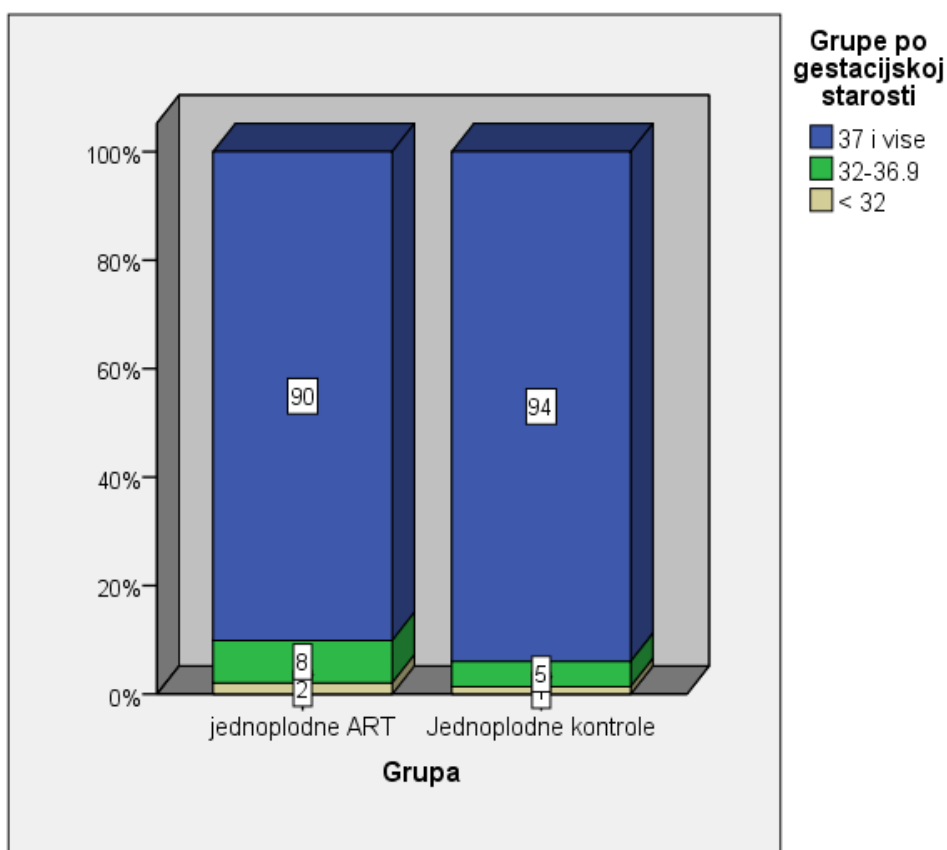
Grafikon br 4. Prenatalna invazivna dijagnostika

Postulati koji važe prilikom završavanja jednoplodnih trudnoća nastalih primenom ART se izgleda razlikuju od onih kojima se lekari rukovode u odnosu na spontane trudnoće. Naime prosečna gestacijska starost u kojoj su ART trudnoće završavane je 38.14 ± 1.82 nedelje, nešto kraća u odnosu na kontrole sa 38.65 ± 1.72 , sa rasponom od 26 do 42 nedelje, sa medijanom 38.2 nedelje prema 39 nedelja, ($t=6.045$, $df=1753$, $p=0.01$), što je razlika koja ima mali klinički značaj, jer su obe vrste trudnoća završavane u 39 nedelji gestacije (tabela br. 6).

Međutim, ako podelimo vreme porođaja na pretermijski i terminski (37 nedelja gestacije) uočavaju se značajne razlike u odnosu na način nastanka jednoplodne trudnoće. Naime, učestalost pretermijskog porođaja u ART grupi je 9.8% od toga 2.% ispod 32 nedelje gestacije, a kod kontrola 6.7% sa 1.4% manje od 32 ng, što čini statistički visoko značajnu razliku ($\chi^2=9.040$, $df=2$, $p=0.01$) i to u kategoriji od 32 do 37 nedelje gestacije (Grafikon br 5).

Tabela br. 6. Vreme i način završavanja trudnoće

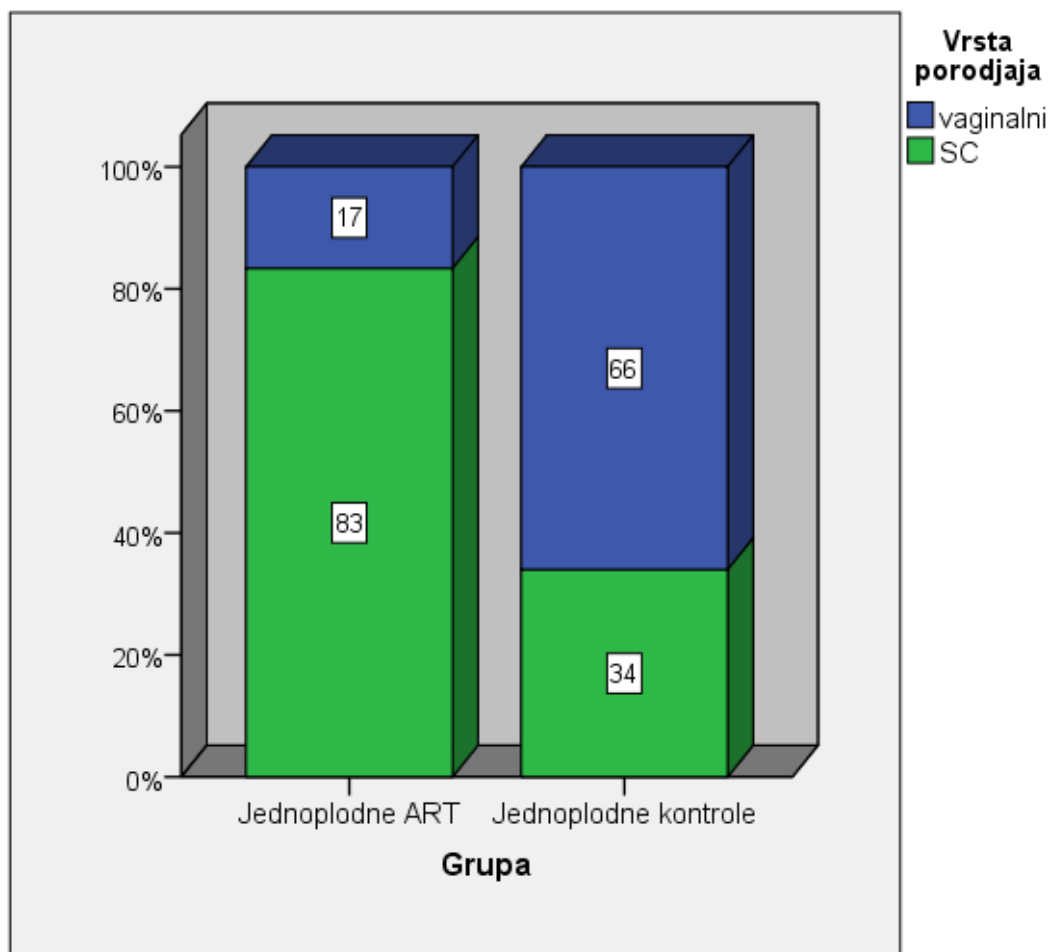
Karakteristika	Jednoplodne ART		Jednoplodne kontrole		Značajnost razlika	
	Broj	%	Broj	%		
Gestacijska starost, prosečna (Xsr ±SD) (meseći)	38.14±1.82		38.65±1.72		t=6.045 p=0.01	
Vaginalni porođaj	147	16.7	582	66.1	$\chi^2=442.78$ P=0.0001	
Operativni vaginalni porođaj, forceps	2	1.2	13	2.2	p=0.443	
Carski rez	elektivni	532	72.5	189	63.2	$\chi^2=8.658$ p=0.03
	hitni	202	27.5	110	36.8	
	ukupno	734	83.3	299	33.9	$\chi^2=442.748$ p=0.0001



Grafikon br 5. Porođaj u odnosu na gestacijsku starost

Način završavanja trudnoće se veoma razlikuje u zavisnosti od načina nastanka trudnoće.(Grafikon br 6). Carski rez je predominantan način završavanja trudnoće nakon ART (83.3%) prema 33.9% kod kontrole, dok je vaginalni porođaj najčešći put porođanja spontanih trudnoća 66.1%, što razliku čini visoko statistički značajnom

($\chi^2=442.748$, $df=1$, $p=0.0001$).

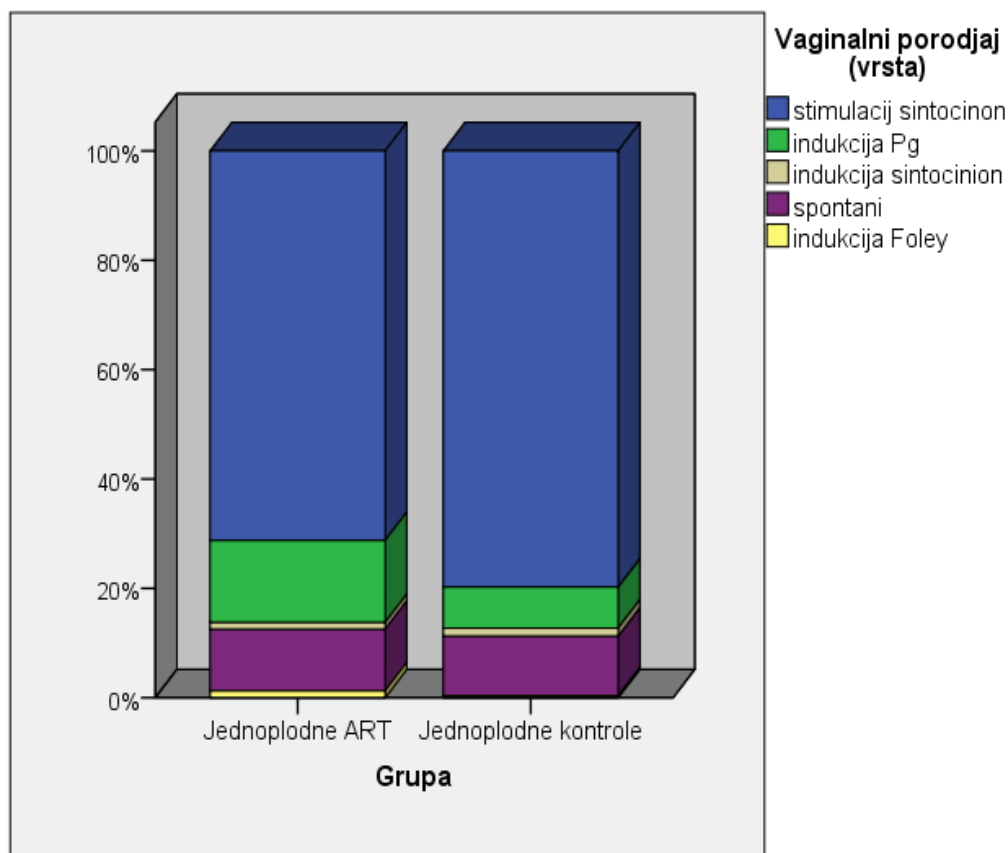


Grafikon br 6. Vrsta porođaja

U obe grupe je najveći deo carskih rezova bio elektivan odnosno planiran 72.5% u odnosu na 63.2% kod kontrola, a veća zastupljenost hitnih carskih rezova je u kontrolnoj grupi 36.8% prema 27.5% kod ART trudnica, što je statistički značajna razlika ($\chi^2=8.658$, $df=1$, $p=0.003$). Međutim, indikacije za elektivni carski rez su sa sličnom učestalosti između grupa, izuzev u ART grupi prisustva indikacije trudnoća nakon IVF sa 25.48%, koja čini suštinu razlike.

Vrste vaginalnog porođaja najčešće obuhvataju stimulaciju sintocinonom (71.2% u ART prema 79.8% kontrola), indukciju prostaglandinom PgE2 (15.0% vs 7.5%), indukciju sintocinonom (1.2% u ART prema 1.9% kontrola) i spontano započinjanje porođaja u 11.2% ART trudnica i 10.9% kontrola. U obe grupe su različiti načini započinjanja vaginalnog porođaja zastupljeni u istom redosledu učestalosti, ali je statistički značajna razlika u frekvenciji korišćenja ($\chi^2=11.072$, $df=4$, $p=0.026$), verovatno odraz

disproporcije u zastupljenosti vaginalnog porođaja u okviru grupa. (Grafikon br 7)



Grafikon br 7. Vrste započinjanja vaginalnog porođaja

Primena operativnog vaginalnog porođaja forcepsom je zastupljenija u kontrolnoj grupi 13 (2.2%) prema 2 (1.2%), kao i periduralne analgezije 19.7% u odnosu na 15.6%, ali bez statističke potvrde značajnosti.

Neonatalne karakteristike uključujući prezentaciju, pol, telesnu masu, dužinu, Apgar skor i pokazatelje rasta su prikazane u tabeli br 7.

Bebe nastale ART imaju u proseku oko 100 grama manju telesnu težinu od kontrola tj 3198.37 ± 596.11 grama prema 3350.00 ± 560.00 grama, što statistički pokazuje visoko značajnu razliku ($t=-4.017$, $df=1760$, $p=0.0001$), sa rasponom težina od 560 do 5300 grama. U ART grupi 90.2% beba ima telesnu masu veću od 2500 grama, nešto manje nego kod kontrola 94.0%.

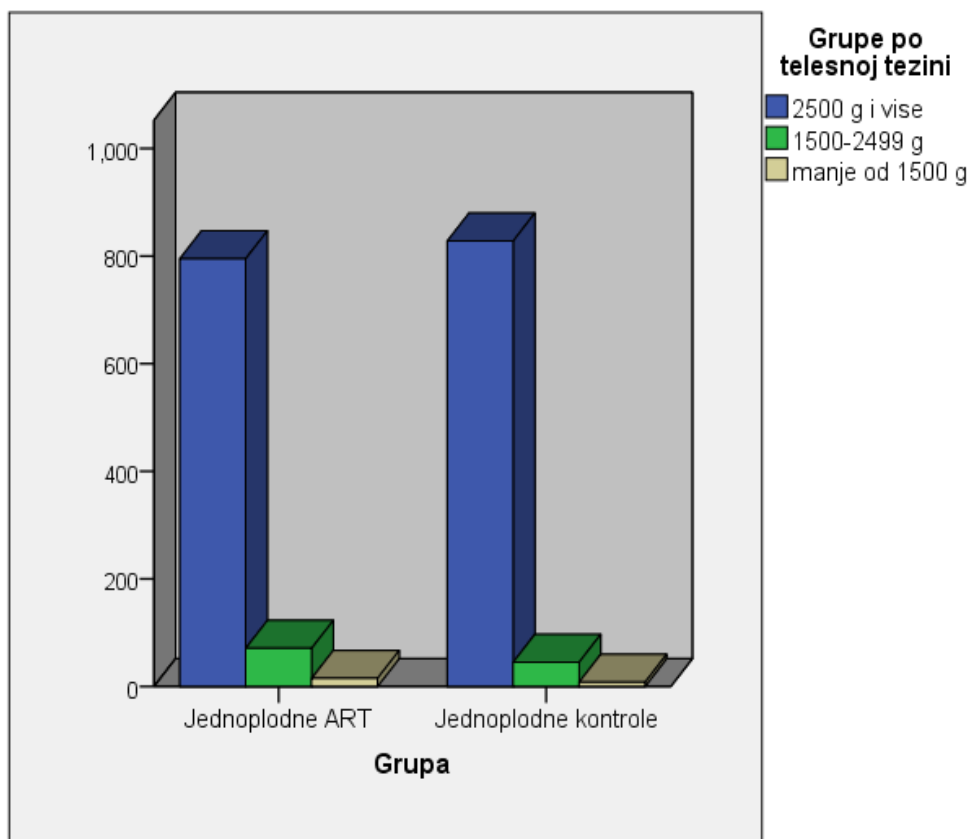
Tabela br 7. Neonatalne karakteristike u jedноплодним trudnoćama

Karakteristika	Jedноплодне ART		Jedноплодне kontrola		Značajnost razlika	
	Broj	%	Broj	%		
prosečna telesna masa na porođaju (Xsr ±SD) [gr]	3198.37±596.11		3350.00±560.00		t=-4.017 p=0.0001	
dužina neonatusa, prosečna (Xsr ±SD) [cm]	50.16±3.27		50.53±2.79		p=0.452	
Telesna težina (gr)	≥2500	795	90.2	82.8	94	p=0.523
	1500-2499	71	8.01	45	5.1	χ ² =6.239 p=0.002
	≤1500	15	1.7	8	0.9	p=0.148
pol	M	422	47.9	452	51.3	p=0.153
	Ž	459	52.1	429	48.7	
prezentacija	glavica	772	87.6	791	89.8	p=0.153
	ostalo	109	12.4	90	10.2	
SGA (<10 percentila)	32	3.6	30	3.4		p=0.899
LGA (>90 percentila)	12	1.36	9	1.02		p=0.829
Prosečan APgar u prvoj minuti (Xsr ±SD)	8.25±1.28		8.52±1.28			t=-3.996 p=0.0001
APgar u prvom minutu (<7)	123	14.1	83	9.5		χ ² =9.167 p=0.01
Mrtvorodenost	10	1.1	4	0.5		p=0.107

Međutim u kategorijama LBW (low birth weight) tj porođajna masa ispod 2500 grama, registrujemo veću učestalost ART beba (71/881) 8.1% prema 5.1% (45/881) u rasponu težina od 1500 do 2499 grama ($\chi^2=6.239$, $df=1$, $p=0.02$), dok se sa težinama ispod 1500 grama odnosno VLBW, ne razlikuje značajno zastupljenost 1.7% (15/881) prema 0.9% (8/881) (Grafikon br 8). Rizik rađanja deteta sa telesnom težinom ispod 2500 grama je veći u ART grupi uopšte, i značajno je veći nego kod spontano nastalih beba ($\chi^2=8.629$, $df=2$, $p=0.013$).

Što se tiče pola neonatusa u ART grupi je zastupljenije nešto više devojčica (459) 52.1% u odnosu na (422) 47.9% dečaka, a kod kontrola više dečaka (452) 51.3% u odnosu na (429) 48.7%) devojčica, ali razlika nije statistički značajna ($\chi^2=2.043$, $df=1$, $p=0.153$). Devojčice u ART grupi imaju veću verovatnoću niže telesne mase odnosno veću zastupljenost manjih telesnih masa ispod 2500 grama LBW (46/459; 10.0%) i 1500 grama VLBW (9/459; 2,0%) ($\chi^2=16.662$, $df=2$, $p=0.001$) u odnosu na kontrole (LBW 19/429; 4.4% i 1/429; 0.2% VLBW), dok kod dečaka nalazimo jednaku distribuciju telesnih težina između grupa ($\chi^2=0.035$, $df=2$, $p=0.983$), posebno ispod 2500 grama, što nije značajna pojava. Takođe u ART grupi 88.0% devojčica je teže od 2500 grama u odnosu na 95.3% kontrola, što je statistički visoko značajno. Znači, distribucija telesne

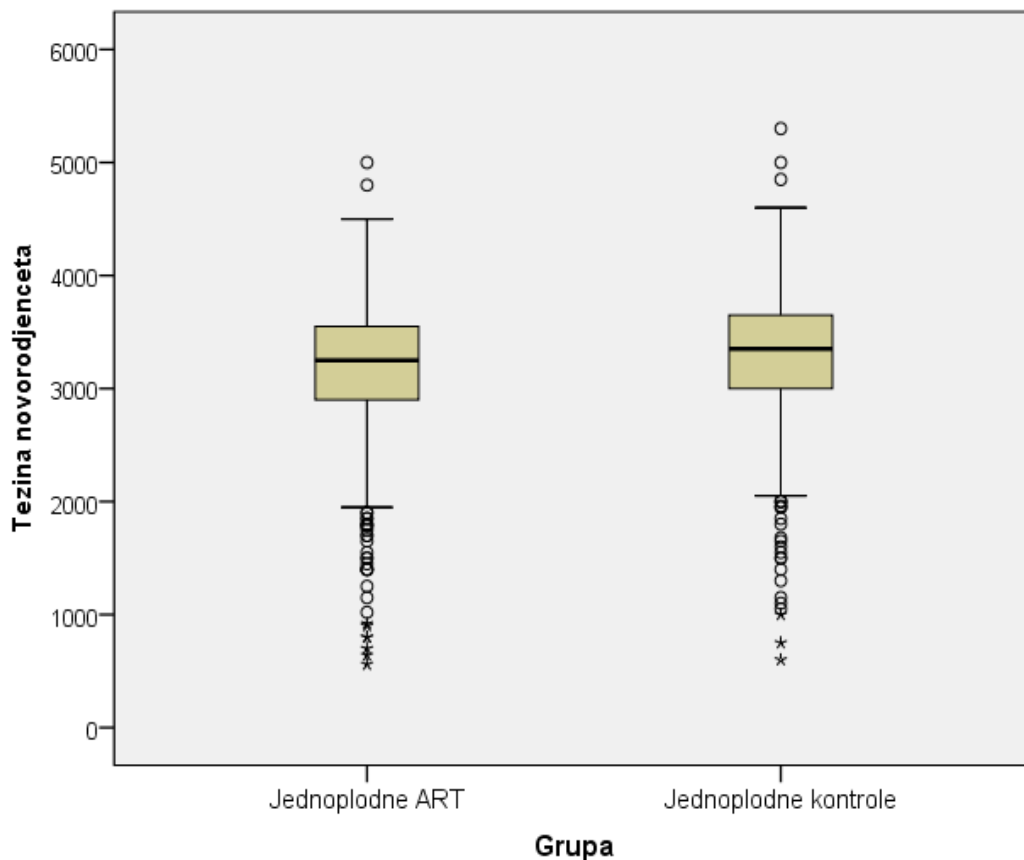
mase po intervalima pokazuje zavisnost od pola u slučaju devojčica.



Grafikon br 8. Telesna težina neonatusa u jednoplodnoj trudnoći

Prosečna dužina neonatusa u ART grupi je 50.16 ± 3.27 cm, nešto kraća nego kontrole sa 50.53 ± 2.79 cm, sa medijanom od Med 50 u ART i 51 cm u kontrolama, odnosno od 28 do 57 cm rasponom kod kontrola i 30.00 cm do 60.00 cm kod ART beba.

Plod je najčešće prednjačio glavicom (okcitoanterior) i to u ART 87.6%, a kod kontrola 89.8% ($\chi^2=2.045$, $df=1$, $p=0.153$), a ostale prezentacije su u 12.4% ART i 10.2% kontrola. Slede po učestalosti prednjačenje karlicom 8.3% ART prema 4.8% kontrola, pa zadnji potiljačni stav 1.1% prema 4.1%, i stopalcima 0.9% prema 0.3%. Ostale prezentacije u vidu visokog pravog stava, kosog položaja, lične prezentacije, poprečnog položaja, temenog i čeonog stava, 18 slučajeva kod ART (2.0%) u odnosu na 9 (0.9%) kod kontrola.



Grafikon br 9. Distribucija telesne mase neonatusa u jednoplodnoj trudnoći

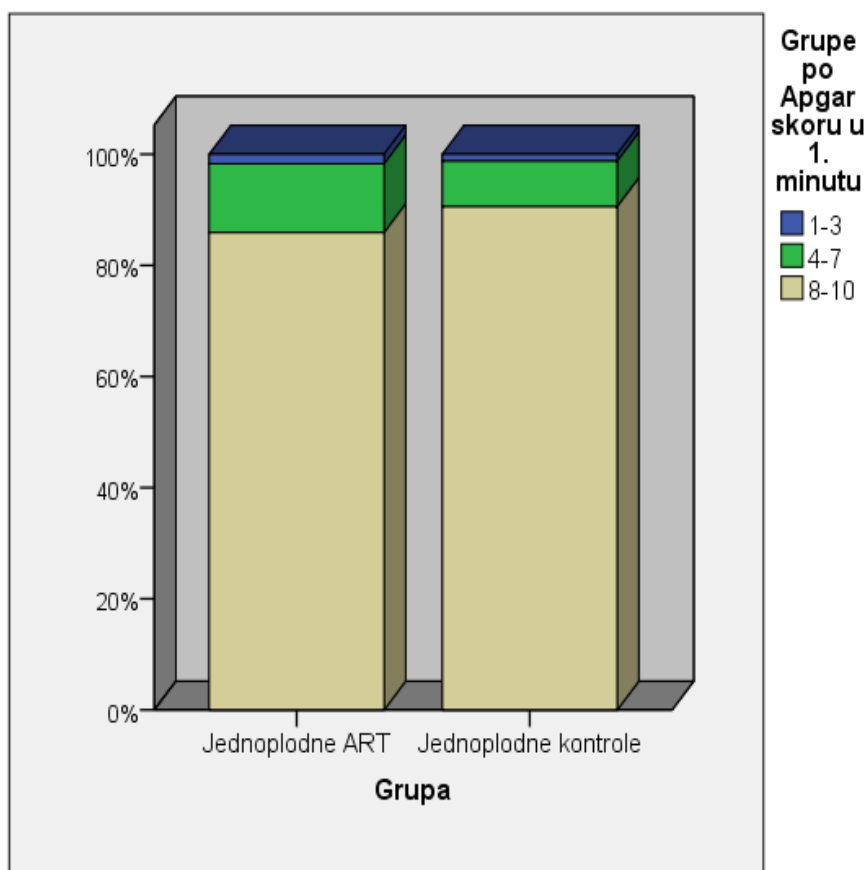
Poremećaji rasta u trudnoći odnosno IUGR (intrauterine growth restriction) ili SGA (small for gestation age) označava rast manji od 10 percentila očekivanog rasta za gestacijsku nedelju u slučaju uredno datirane trudnoće (kriva normalne raspodele) i u ART grupi sa 3.6% (32/881) odnosno 3.4% (30/881), ne pokazuje značajniju razliku (grafikon br 9) ($\chi^2=0.213$, $df=2$, $p=0.899$), i odgovaraju pokazateljima u populaciji. Prisustvo makrozomičnog rasta odnosno rasta iznad 90 percentila za datu gestacijsku starost (LGA large for gestational age) je podjednako zastupljeno između grupa 12/881 tj. 1.36% u ART prema 9/881 tj 1.02% kod kontrola. ($\chi^2=0.213$; $df=2$, $p=0.899$).

Apgar score se prilikom porođaja određuje u 1 minuti i u 5 minuti. Prosečne vrednosti apgar skora u 1 minuti su 8.25 ± 1.56 u ART grupi što je slično kontrolama 8.52 ± 1.28 , sa medijanom Med 9.00 za obe grupe. Razlika pokazuje visoku statističku značajnost $t=-3.996$, $df=1760$, $p=0.001$, ali pošto je Apgar skor ceo broj i iznosi više od 8, klinička i praktična razlika nema značaja.

Najveći broj dece ima Apgar skor od 8 do 10 u 1 minuti i to 85.9% u ART grupi, dok

kontrola ima veći broj 88.2%, odnosno značajno veći broj dece ima najviše ocene ($\chi^2=9.167$, $df=2$, $p=0.01$). Intrauterina smrt odnosno mrtvorodenost se definiše kao uginuće ploda nakon 22 nedelje gestacije sa Apgar skorom 0 zabeležena je u 10 (1.1%) slučajeva kod ART trudnoća i 4 (0.5%) spontanih gestacija. Navedena razlika ne pokazuje statističku značajnost ($\chi^2=2.592$, $df=1$, $p=0.107$). Mrtvorodenost je zabeležena kod i ženskog ploda u 39 ng, težine 3450 grama sa pravim čvorom pupčanika, II zatim u 34 ng, težine 2200 grama sa hidrotoraksom; III u 31ng, težine 1250 grama zbog horioamnionitisa; IV u 31 ng, težine 1400 grama zbog marginalne placente previje; V u 35 ng, težine 1450 grama sa teškim IUGR; VI u 38ng ,ž, težine 2700 grama zbog fetocida zbog Down sindroma; VII u 36ng, m, 2200gr, sa IUGR zbog asfiksije; VIII u 35 ng, 1500 grama, IUGR i asfiksija fetusa; IX u 38ng, m, 2700 grama, iznenadna; X u 28 ng, m, 1150 grama, prematuritet. Samo jedan slučaj je indikovana intervencije fetocida zbog Down sindroma u 38 nedelji gestacije kod ženskog ploda, nakon potvrđenog kariotipa kordocentezom.

Značajno više dece u ART grupi (14.1%) pokazuje vrednosti Apgar skora niže od 7 ($\chi^2=9.167$, $df=2$, $p=0.01$) u 1 minuti u odnosu na kontrole (9.5%). Ako podelimo opseg Apgar skora u intervale od 4-7 i od 1-3, primećujemo da je ova razlika rezultat razlike u pojavi kategorije Apgara od 4-7 odnosno 12.4% prema 7.2%. Ako uzmemo u obzir Ap vrednosti u 1 minuti i vrednost Ap 0, vrednosti Ap između ART beba i kontrola se značajno razlikuju ($\chi^2=11.759$; $df=3$, $p=0.008$) (Grafikon br 10).



Grafikon br 10. Vrednosti Apgar skora u 1 minutu jednoplodnih trudnoća

Međutim u rezultatima Apgar skorova u 5 minuti dolazi do komparabilnih rezultata odnosno u ART grupi do popravljanja vrednosti tj. rastući Apgar, pa se navedene razlike u kategoriji Apgara ispod 7 više ne evidentiraju. Odnosno, bebe u ART grupi pokazuju usporeniju adaptaciju, ali nakon intervala se izjedanačavaju sa kontrolama.

Prosečne vrednosti 5 minutnog Apgara su skoro približne sa 8.56 ± 1.37 u ART grupi u odnosu na 8.67 ± 1.13 kod kontrola sa medijanom vrednosti obe grupe oko 9. Udeo Apgara ispod 7 u petoj minuti je komparabilna između grupa sa 6.7% kod ART i 5.7% kod kontrola, i odnosom od 1.0% i 0.9% najmanjih vrednosti Apgara 1-3 ($\chi^2=0.871$, $df=2$, $p=0.647$).

Učestalost kongenitalnih anomalija je veća kod jednoplodnih trudnoća nakon primene ART, ali razlika nije statistički značajna ($\chi^2=2.703$, $df=1$, $p=0.100$). Naime u ART grupi je evidentirano 16 beba sa anomalijama (1.8%), a kod kontrola 8 (0.9%). Spektar anomalija u ART grupi obuhvata najčešće 4 srčane mane u vidu ASD (atrijalni septalni defekt) sa insuficijencijom MV i AV, zatim VSD sa stenozom a. pulmonalis i

transpozicijom velikih krvnih sudova, ASD kod fetusa sa Down sindromom, zatim kompletni AV kanal, 4 anomalije skeleta sa PEV sinistra et genu recurvatum i suspektom artrogripozom, pa 2 slučaja PTV (pes talovalgus), anomaliju skeleta desne šake, pa 2 slučaja cističnih intraabdominalnih tumora kod ženskih fetusa, 2 slučaja ingvinalnih hernija, 1 policističnu displaziju desnog bubrega, 1 cistu horiodnog pleksusa, 1 slučaj hidrotoraksa. U kontrolnoj grupi imao 2 slučaja srčane mane i to tetralogio Phallot i kompleksu srčanu manu, zatim 3 anomalije CNS i to agenezio vermis cerebeluma, zatim microcefaliju kod Patau sindroma sa agenezijom bubrega, kao i disrafizmus spinalis, 1 slučaj anusa anteriora, 1 intraabdominalni cistični tumafkt kod ženskog fetusa i 1 slučaj hidrotoraksa kod ženskog fetusa. Dok su u ART grupi najzastupljenije anomalije KVS sistema i anomalije skeleta, u kontrolnoj grupi su najčešće anomalije CNS i kardovaskularne malformacije (Tabela br 8).

Tabela br 8. Fetalna i neonatalna patologija u jednoplodnim trudnoćama.

Karakteristika	Jednoplodne ART		Jednoplodne kontrola		Značajnost razlika
	Broj	%	Broj	%	
Prijem u NICU	36	4.1	23	26	p=0.08
Prosečan boravak u NICU (Xsr ±SD) (dani)	7.67±7.05		4.61±3.76		p=0.179
Kongenitalne anomalije	16	1.8	8	0.9	p=0.100
Hromozomopatije	3	0.34	2	0.23	p=0.684
Neonatalni mortalitet	6	0.77	8	1.02	p=0.302
Perinatalni mortalitet	16	1.82	12	1.36	p=0.45

Hromozomopatije i učestalost patološkog kariotipa su zastupljeniji u ART grupi sa 3 slučaja tj slučajem Sindroma 2Y tj 47 XYY, kod živorođenog fetusa muškog pola, 1 slučajem Down sindroma kod ženskog fetusa sa 47XX+21, kod koga je urađen fetucid u 38 nedelji gestacije sa srčanom manom i slučaj pericentrične inverzije 46XY inv9 (p12,q13), dok u kontrolnoj grupi imamo 2 abnormalna kariotipa i to sindrom Patau 47XX+13 kod koje je urađen fetucid u 26 nedelji gestacije, i 1 slučaj pericentrične inverzije 46XY inv 9 (p12q13) sa Tetralogia Phallot, ali bez statistički značajne razlike (p=0.684).

Prosečna učestalost tj frekvencija prijema u NICU (neonatal intensive care unit) je veća u ART grupi sa 36(4.1%) u odnosu na kontrole 23 (2.6%), ali bez značajnosti rezultata ($\chi^2=2.964$; df01, p=0.085). Iako su u proseku ART bebe 3 dana duže boravile u NICU sa 7.67±7.05 dana u odnosu na 4.61±3.76 boravka kontrola, sa medijanom 5.5 odnosno 5.0

dana razlika ne pokazuje statističku značajnost ($U=328.500$, $z=-1.344$; $p=0.179$). ART bebe su u NICU boravile maksimalno 26 dana, a kontrole 15 dana, sa najkraćim boravkom od 1 dana.

Iz neonatalne intenzivne nege je u ustanovu višeg neonatalnog nivoa prebačeno po 8 neonatusa izm ART(8/36; 22.2%) i kontrolne grupe (8/19; 42.1%), ali bez značajnosti razlika ($\chi^2=3.320$; $df=1$, $p=0.190$), od toga imamo po 4 egzitusa u Art (50.00%) i 6 egzitusa u kontrolnoj grupi (75.0%), što je iznenađujuće, ali bez značajnosti rezultata ($\chi^2=1.067$, $df=1$, $p=0.302$).

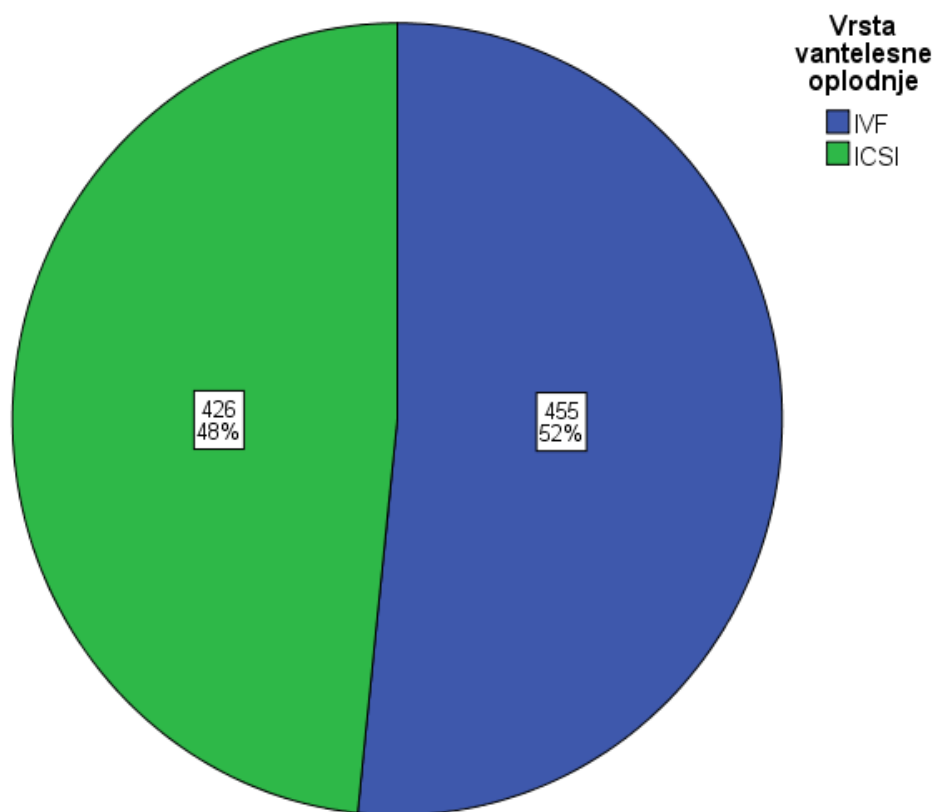
Perinatalni mortalitet obuhvata intrauterini mortalitet i neonatalni do 45 dana od rođenja i iznosi 16/881 odn 1.816% ili 18.16/1000 rođenja ART jednoplodnih viši je nego kod spontanih jednoplodnih sa 12/881 tj 1.362% ili 13.62 na 1000 rođenih. Neonatalni mortalitet iznosi 6/871 tj 0.688% tj 6.88 /1000 kod ART beba i 8/877 tj 0.912% odnosno 9.12/1000 živorođenih, što govori o većem neonatalnom mortalitetu kod spontanih trudnoća.

Pitanje uticaja metode ART tj da li upotreba IVF ili ICSI utiče na perinatalni ishod jednoplodnih trudnoća i pojavu komplikacija u trudnoći. Nešto je više rađeno klasične metode IVF, ali skoro u podjednakom procentu kao ICSI sa rezultatom jednoplodne trudnoće (Grafikon br 11).

Prosečna starost žena kod kojih je primenjena IVF metoda je 35.88 ± 4.41 godina, u rasponu od 20.00 do 45 godina, a ICSI metoda kod nešto mlađih 35.51 ± 4.13 godina, sa rasponom godina od 22.00 do 45 ($t=1.290$; $df=2$, $p=0.197$). Međutim postoji razlika primene po dobnim intervalima odnosno ICSI je korišćen češće kod mlađih žena tj kod 39% ispod 35 godina i kod 45.3% od 35-39 godina, a IVF je češće korišćen kod starijih od 40 godina sa 22.4% u odnosu na 15.7% ICSI, što je značajno statistički ($\chi^2=6.653$; $df=2$; $p=0.036$). Odnosno kod žena sa primenom ART metode nakon 40 godina ima manje nedektovanog muškog faktora infertiliteta, a često je u pitanju i manji broj oocita lošijeg kvaliteta, pa je IVF metoda prihvatljivije rešenje odnosno dala je bolje rezultate.

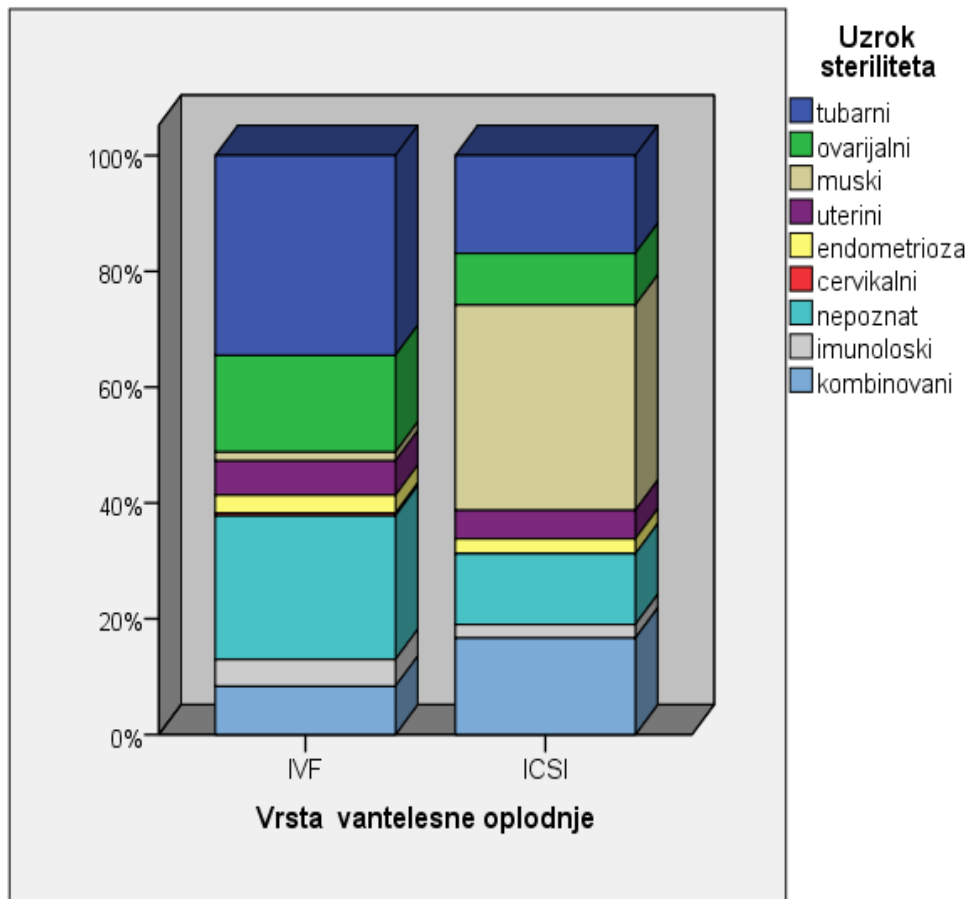
Ako posmatramo stepen obrazovanja kod onih sa osnovnim obrazovanjem više je upotrebljavana IVF sa 15.4%, kod višeg ili visokog ICSI sa 47.7%, a obe podjednako kod onih sa srednjim 40.4%, ali bez značajnosti ($\chi^2=2.446$, $df=2$, $p=0.294$). Nema razlike u broju dosadašnjih trudnoća (Graviditet), najviše bez trudnoća u anamnezi (IVF 79.6% prema ICSI 82.4%, $p=0.261$), broju porođaja (nulipare 94.3% IVF prema 95.3%

ICSI, $p=0.494$), broju spontanih pobačaja (bez abortusa 89.2% kod IVF i 91.1% ICSI, $p=0.354$), kao i broju ektopičnog graviditeta (bez 94.3% u IVF i 94.1% u ICSI, $p=0.992$).



Grafikon br 11. Vrste metode IVF, ICSI u odnosu na faktore infertiliteta kod jednoplodnih trudnoća

Očekivano, uzroci infertiliteta se veoma razlikuju u zavisnosti od primenjene metode odnosno oni su uslov za primenu različitih metoda (Grafikon br 12).

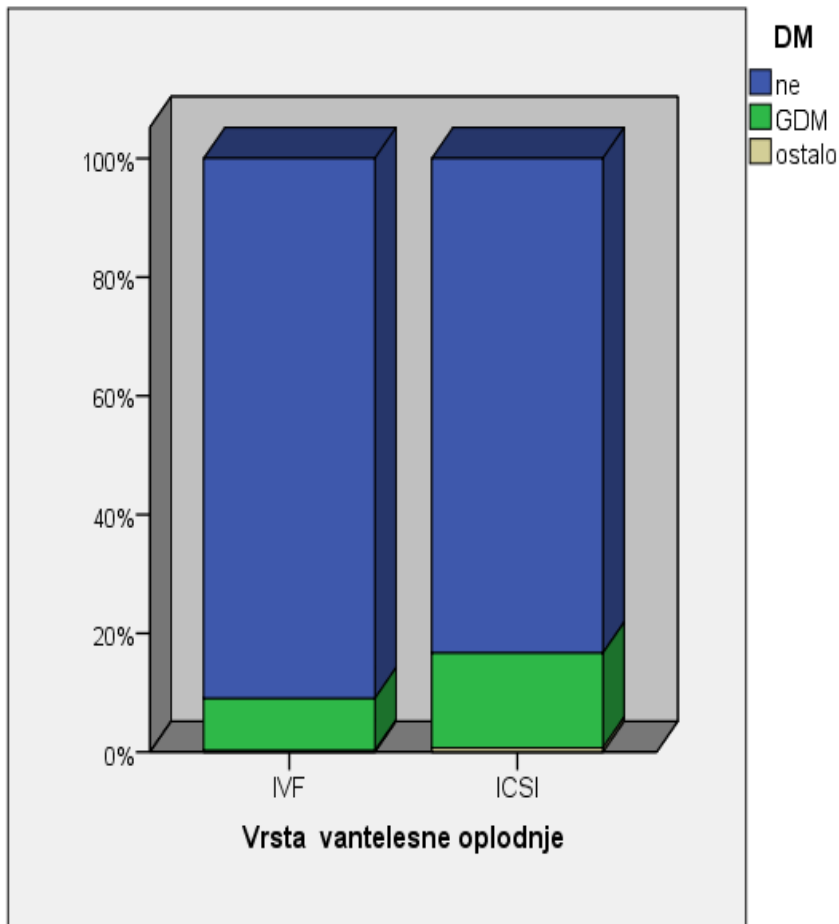


Grafikon br 12 Vrsta vantelesne oplodnje u odnosu na faktor infertiliteta

ICSI je korišćen sa 95.6% kod muškog infertiliteta, zatim slede kombinovani uzrok, 65.1%, endometrioza 44.0%, uterini 43.8% i udeo u ovarijalnom 33.3% i tubarnom sa 31.4%, dok je IVF najčešći u strukturi tubarnog faktora 68.6%, nepoznatog sa 68.55, imunološkog sa 67.7%, pa zatim 56.2% uterinog i 56% endometrioze, što je visoko značajna različitost ($\chi^2=214.291$, $df=8$, $p=0.000$).

Hipertenzivni poremećaji u trudnoći (PIH, PE, Eclampsio) su zastupljeniji u jednoplodnim trudnoćama nastalim ICSI metodom (IVF 13/455, 13.6% u odnosu na ICSI 68/426, 16.0%), ali razlika nije značajna ($\chi^2=2.976$, $df=2$, $p=0.226$).

Međutim, pojavu gestacijskog dijabetesa nalazimo značajno češće kod trudnoća nastalih ICSI metodom 68/426 tj 16.0% u odnosu na IVF 8.8% (40/455) ($\chi^2=11.844$, $df=2$, $p=0.003$) (Grafikon br 13).



Grafikon br 13. Učestalost gestacijskog dijabetesa kod ART jednoplodnih trudnoća kod IVF i ICSI metode

Od ostalih perinatalnih komplikacija u jednoplodnim ART trudnoćama nema razlike u kategorijama centralne placente previje sa 1 slučajem u ICSI grupi (0.2%), abrupcije placente sa 3 slučaja u IVF grupi (0.7%), preterminske prevremene rupture plodovih ovojaka ispod 37 nedelje gestacije 4.4% IVF prema 2.8% ICSI ($\chi^2=2.694$, $df=2$, $p=0.260$), primeni invazivne dijagnostike 57.1% IVF prema 58.7% ICSI ($\chi^2=3.753$; $df=5$, $p=0.586$), kao ni aplikacije serklaža sa 2.6% kod IVF jednoplodnih i 3.5% kod ICSI jednoplodnih ($\chi^2=0.894$, $df=1$, $p=0.344$).

Prosečna starost jednoplodnih trudnoća nakon ART je skoro ista sa IVF trudnoćama u vreme porođaja je 38.07 ± 1.81 nedelja, a ICSI je 38.22 ± 1.83 ($t=-1.200$, $df=879$, $p=0.230$). Učestalost prevremenih preterminskih porođaja pre 37 nedelje gestacije je veća u IVF grupi sa 9.5% od 32-36.9 nedelje i 1.8% ispod 32 nedelje u odnosu na 6.1% i 2.3% kod ICSI, ali bez statističke značajnosti razlike ($\chi^2=3.707$, $df=2$, $p=0.157$).

Način porođaja koji je dominantan u obe grupe jednoplodnih ART trudnoća je carski rez sa 376/455 tj 82.6% u IVF grupi i 84% u ICSI (358/426), što nije značajan statistički rezultat ($\chi^2=0.310$, Df=1, p=0.578). U indikacijama za carske rezove dominiraju elektivni odnosno planirani sa 70.2% kod IVF i 74.9% kod ICSI, a i udeo hirnih carskih rezova je skoro podjednak (29.8% IVF prema 25.1% ICSI), što takođe ne predstavlja značajan nalaz ($\chi^2=1.986$, df=1, p=0.159).

Kod vrste vaginalnog porođaja metoda ART ne utiče na način započinjanja porođaja odnosno protokole postupanja sa ART trudnoćama. Najčešći vid u obe grupe započinjanja porođaja je stimulacija sintocinonom u 12.1% kod IVF i 13.8% kod ICSI, zatim indukcija prostaglandinom 2.9% IVF prema 2.6% ICSI, a zatim spontano započinjanje porođaja 2.9% IVF prema 1.2% ICSI ($\chi^2=5.526$, df=5, p=0.355). Primena forcepsa je retka kod ovih trudnoća i po jedan slučaj izlaznog forcepsa je aplikovan u obe grupe tj 0.2%. S obzirom na nisku zastupljenost vaginalnog porođaja kao opcije, nešto je veća primena periduralne analgezije u ICSI trudnoćama 15/426 (3.5%) u odnosu na IVF 10/455 (2.2%), ali razlika nije značajna ($\chi^2=1.397$, df=1, p=0.237).

I kod IVF jednoplodnih trudnoća, kao i kod onih koje su nastale ICSI metodom plodovi su najčešće prednjačili glavicom (okcipitoanteriorni položaj) i to 87.0% u IVF prema 88.3% u ICSI ($\chi^2=10.918$, df=10, p=0.364).

U slučaju primene obe metode ART u jednoplodnim trudnoćama ima nešto više devojčica tj kod IVF 52.7% i kod ICSI 51.4% ($\chi^2=0.158$, df=1, p=0.691).

Primena različite metode IVF kod jednoplodnih trudnoća ne dovodi do promene u prosečnoj telesnoj težini ploda kod IVF 3182 ±612.41gr i oko 30 grama teže kod ICSI sa 3215.58±578.40 (t=-0.825,df=879, p=0.407). Što se tiče dužine prosečne dužine ploda skoro su iste dužine tj 50.14±3.28cm kod IVF i 50.18±3.25 cm kod ICSI (t=-0.171, df=879, p=0.864).

Više dece telesne težine manje od 2500 grama ima nakon IVF i to 9.0% u rasponu od 1500-2499 grama i 2.0% manje od 1500 grama u odnosu na ICSI metodu 7.0% i 1.4%, ali razlika nije statistički značajna ($\chi^2=1.634$, df=2, p=0.442).

Pojava poremećaja rasta u vidu intrauterine restrikcije rasta IUGR je češća kod IVF i to u 18 slučajeva (4.0%) u odnosu na ICSI 14 (3.3%) i definiše se kao rast manji od 10 percentila u odnosu na očekivani. U slučajevima makrozomije ploda imamo obrnutu

situaciju tj 9 beba u ICSI grupi (1.64%) a pet slučajeva u IVF grupi (1.09%), što praktično znači da navedene razlike ne pokazuju značajnost ($\chi^2=1.410$, $df=2$, $p=0.494$).

Prosečne vrednosti Apgar skorova u 1 minuti su više kod ICSI jednoplodnih beba sa 8.31 ± 1.68 u odnosu na IVF bebe 8.20 ± 1.68 , ali razlika ne dostiže statističku značajnost ($t=-1.131$, $df=879$, $p=0.258$). Prosečni apgar skorovi u 5 minuti se popravljaju i viši su, ali se zadržava isti odnos između metoda odnosno viši su nakon ICSI 8.62 ± 1.21 u odnosu na IVF 8.49 ± 1.51 ($t=-1.404$, $df=879$, $p=0.161$).

Veća učestalost kada su neonatusi ocenjivani Apgarom manjim od 7 u 1 minuti je ako je trudnoća nastala nakon klasične metode IVF i to 16.7% (76/455) nego nakon ICSI sa 13.4% (57/426), ali razlika ne dostiže značajnost ($\chi^2=3.220$, $df=3$, $p=0.359$).

Mrtvorodenost odnosno intrauterina smrt ploda nakon 24 nedelje gestacije sa najmanjom telesnom masom 500 grama se češće dešava u trudnoći postignutoj IVF metodom 7/455 (1.5%) nego nakon ICSI 3/426 (0.7%), ali razlika nije statistički značajna ($\chi^2=1.364$, $df=1$, $p=0.243$).

Pojava anomalija (major i minor) je skoro dvostruko veća nakon ICSI metode sa 2.6% odnosno u 11 slučajeva, a nakon IVF u 5 slučajeva (1.1%), ali razlika nije statistički značajna ($\chi^2=2.715$, $df=1$, $p=0.099$).

Hromozomopatija ima nakon ART samo 3 slučaja i to 2 nakon ICSI 1 slučaj Sy Down kod ženskog fetusa sa urađenim fetocidom u 38 nedelji i 1 slučaj pericentrične inverzije inv9 (p12q13) kod muškog fetusa rođenog u terminu, a nakon IVF 1 slučaj muškog fetusa sa sindromom 47XYY živorođenog u terminu.

Perinatalni mortalitet je viši ako je beba začeta nakon IVF 24.17‰o promila nego kada je nakon ICSI sa 11.77‰o, ali ne postiže statističku značajnost.

Kod blizanačkih trudnoća poredili smo ishode 560 blizanačkih trudnoća nakon primene ART sa 560 blizanačkih trudnoća jednačenih po godinama majke, zanimanju, paritetu, mestu i vremenu porođaja.

Prosečna starost žena sa blizanačkim trudnoćama iz ART je 34.21 ± 4.08 godina u odnosu na spontane blizanačke trudnoće sa 33.91 ± 3.91 godina uz raspon od 20 do 45 godina, što ne pokazuje značajnu razliku ($t=1.249$, $df=1118$, $p=0.212$). Trudnice sa gemelarnim trudnoćama su mlađe u odnosu na trudnice sa jednoplodnim ART trudnoćama, čiji je prosek godina 35.70 ± 4.28 godina. Najviše žena je mlađe od 35

godina 282/560 50.4% u ART grupi i 289/560 tj 51.6% kod spontanijh blizanaca, a iznad 40 godina je 8.8% kod ART i 6.6% kod kontrola ($\chi^2=1.814$, $df=2$, $p=0.404$).

Najviše žena ima više i visoko obrazovanje 45.2% u ART grupi i 43.4% kod kontrola, a najmanje je zastupljeno osnovno obrazovanje sa 70/560 tj 12.5% u ART blizancima i 81/560 i 14.5% kod kontrola ($\chi^2=1.005$, $df=2$, $p=0.605$) (tabela br 9).

Tabela br 9. Opšte materalne karakteristike kod blizanačkih trudnoća

Karakteristika		Gemeli ART n=560		Gemeli kontrola n=560		Značajnost razlika
		Broj	%	Broj	%	
Starost (Xsr±sd)		34.21±4.08		33.91±3.90		p=0.212
Školska sprema	Niska	70	12.5	81	14.5	p=0.605
	Srednja	237	42.3	236	42.1	
	Visoka	253	45.2	243	43.4	
Dobne grupe [god]	<35	282	50.4	289	51.6	p=0.404
	35-39	229	40.9	234	41.8	
	>39	49	8.8	37	6.6	

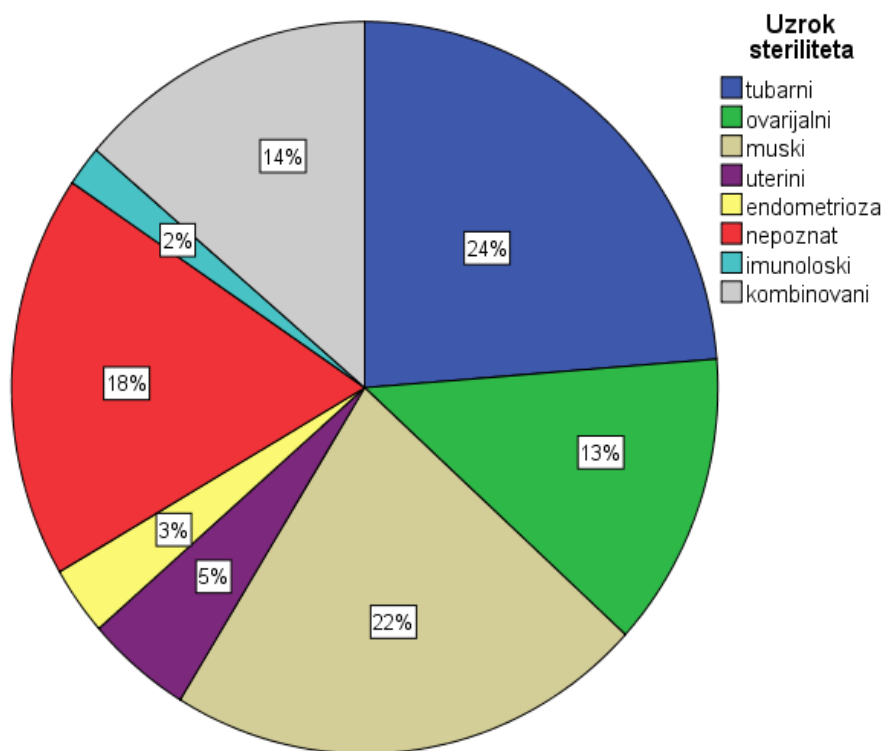
Prema ranijoj akušerskoj anamnezi žene koje su blizanačku trudnoću ostvarile postupkom ART imaju u manjem procentu zabeležene trudnoće u anamnezi 17.5%, nego spontana populacije 27.9%, što je značajna razlika ($U=140841$, $z=-4.043$, $p=0.000$).

Na osnovu pariteta nema razlike između grupa sa 95.4% u ART blizancima i 90.4% kod kontrola bez porođaja ($U=164843$, $z=-1.328$, $p=0.245$). Na osnovu broja ranijih spontanijh pobačaja 92.3% u ART grupi nema zabeležene spontane pobačaje u anamnezi, kao ni 89.8% kontrola, što govori u prilog veće učestalosti neuspaha reprodukcije u ART populaciji, ali ne značajno različitoj od spontane populacije ($U=152843$, $z=-1.479$, $p=0.139$). Međutim, u pogledu prisustva ektopičnog graviditeta imamo evidentnu razliku sa većom učestalošću u ART populaciji, sa zabeleženom značajnošću ($U=146997.00$, $z=5.850$, $p=0.000$) (Tabela br 10).

Tabela br 10. Podaci iz akušerskih anamneza žena iz blizanačke populacije

Karakteristika		Gemeli ART		Gemeli kontrola		Značajnost razlika
		Broj	%	Broj	%	
Graviditet	0	462	82.5	404	72.1	Z=-4.043 p=0.0001
	1	76	13.6	125	22.1	
	2	14	2.5	24	4.3	
	≥3	8	1.4	7	1.1	
Paritet	0	534	95.4	506	90.4	Z=-1.021 p=0.280
	1	24	4.3	46	8.2	
	2	2	0.4	7	1.2	
Broj spontanij abortusa	0	517	92.3	503	89.8	Z=-1.479 p=0.139
	1	30	5.4	37	6.6	
	2	8	1.4	16	2.9	
	≥3	5	0.9	4	0.7	
Ektopični graviditet	0	524	93.6	559	99.8	Z=-5.850 p=0.0001
	1	30	5.4	1	0.2	
	2	6	1.1	0	0	

Uzroci steriliteta pokazuju sličnu distribuciju kao i kod jednoplodnih ART trudnoća sa vodećim tubarnim faktorom 24%, zatim muškim 22%, nepoznatim 18% i kombinovanim 14%, što je saglasno sa učestalosti tih faktora u opštoj infertilnoj populaciji (Grafikon br 14. prikazuje uzroke steriliteta).



Grafikon br 14. Uzroci steriliteta kod blizanačkih trudnoća

Procedura klasične in vitro fertilizacije je češće korišćena u ART postupku sa 51.1% prema ICSI sa 48.9%, što je bio slučaj i kod jednoplodnih trudnoća. U odnosu na rezultate ESHRE to je znatno veća učestalost primene IVF metoda u odnosu na prosek gde ICSI obuhvata oko 66% svih ciklusa (Tabela br 11).

Tabela br 11. Vrsta procedure ART kod blizanačkih trudnoća

			Grupa	Total
			blizanci ART	
Vrsta vantelesne oplodnje	IVF	N	286	286
		%	51.1%	51.1%
	ICSI	N	274	274
		%	48.9%	48.9%
Total	N	560	560	
	%	100.0%	100.0%	

U oblasti perinatalnih komplikacija u trudnoći kroz kategorije hipertenzivnih poremećaja u trudnoći, gestacijskog dijabetesa, prevremene preterminske rupture plodovih ovojaka, prisustva centralne placente previje, abrupcije placente, potrebe za aplikacijom serklaža i invazivnom dijagnostikom, značajne razlike se javljaju u učestalosti dijagnoze gestacijskog dijabetesa, aplikovanja serklaža i izvođenja prenatalne invazivne dijagnostike (Tabela br 12).

Tabela br 12. Maternalne obstetričke komplikacije u blizanačkoj trudnoći.

Karakteristika		Gemeli ART		Gemeli kontrola		Značajnost razlika
		Broj	%	Broj	%	
Hipertenzivni poremećaj	PIH	106	18.9	89	15.9	p=0.127
	PE	25	4.5	22	3.9	
	ukupno	131	23.4	111	19.8	
GDM	A1	61	10.9	38	6.8	$\chi^2=6.327$ p=0.012
	A2	1	0.2	0	0	
	ukupno	62	11.1	38	6.8	
Placenta previja centralna		5	0.9	1	0.2	p=0.085
Abrupcija placente		3	0.5	8	1.4	p=0.085
PPROM (gestacijska starost)	≤32	23	20.0	17	18.3	p=0.545
	32.0-36.9	57	49.6	53	57	
	Ukupno <37	80	69.6	70	75.3	
PROM	≥37	35	30.4	23	24.7	p=0.545
serklaž		105	18.8	72	12.9	$\chi^2=7.307$ p=0.007
invazivna dijagnostika		244	43.6	202	36.1	$\chi^2=6.572$ p=0.01

Ukupno hipertenzivni poremećaji u blizanačkim trudnoćama se javljaju nešto više u ART nego spontanim T trudnoćama (27.4% prema 23.2%) sa najvećim delom gestacijskom hipertenzijom 18.9% prema 15.9%, preeklampsijom 4.5% prema 3.9%, dok je hronična hipertenzija češća kod kontrola 1.8% prema 1.6%, ali bez statističke značajnosti. Ako uzmemo u obzir pojavu gestacijske hipertenzije, preeklampsije zajedno, znatno češća pojava u ART grupi 24.4% prema 20.5%, što nije značajna razlika ($\chi^2=2.327$, $df=1$, $p=0.127$). Pojava teške forme hipertenzivnog poremećaja u vidu Hellp sindroma se takođe više javlja u ART grupi 7/560 u odnosu na spontanu popupaciju 4/560, ali razlika nije značajna.

Kod ART blizanačkih trudnoća gestacijski dijabetes se značajno češće dijagnostikuje u ART grupi kod 11.1% (62/560) u odnosu na 38/560 sa 6.8%, što je statistički značajno ($\chi^2=6.327$, $df=1$, $p=0.012$).samo jedan slučaj gestacijskog A2 dijabetesa je zabeležen u ART grupi, ostale žene su imale gestacijski A1 dijabetes. Primećujemo i da se gestacijski dijabetes javlja češće u celokupnoj ART populaciji i kod jednoplodnih i kod blizanačkih trudnoća, uz ogradu da verovatno su ovakvi nalazi verovatno u vezi sa uzrokom infertiliteta, a ne samom procedura ART.

Pojava centralne placente previje i abrupcije placente se javlja češće nego u jednoplodnim trudnoćama, ali bez razlike gemelarnih trudnoća u odnosu na primenu ART ($\chi^2=4.940$, $df=2$, $p=0.085$). Naime, imamo čak i češću pojavu abrupcije placente u

spontanoj populaciji to 8 slučajeva (1.4%) u odnosu na 3 kod ART (0.5%).

Preвременa pretermijska ruptura plodovih ovojaka (PPROM) u periodu trudnoće pre 37 nedelje gestacije se javlja u 80/560 tj 14.28% kod ART, a 12.50% kod kontrola ($\chi^2=1.215$, $df=2$, $p=0.545$). Najnepovoljnija ruptura plodovih ovojaka sa kliničkog aspekta je u gestacijskoj starosti manjoj od 32 nedelje, je i najređa sa 23 (4.1%) slučaja u ART grupi i 17 (3.03%) kod kontrola.

Primena invazivne dijagnostike u blizanačkim trudnoćama je ređa nego u jednoplodnim. Naime, u blizanačkim ART trudnoća invazivna dijagnostika je primenjena u 43.6%, dok u spontanim blizanačkim trudnoćama u 36.10%, što se značajno razlikuje ($\chi^2=6.572$, $df=1$, $p=0.01$). Najviše primenjivana je genetska amniocenteza u skoro polovini slučajeva 191 (34.1%) prema 169 (30.2%), a zatim biopsija horionskih čupica sa 7.9% u ART i 4.1% kod spontanih kontrola.

Ginekolozi se mnogo lakše odlučuju za aplikaciju serklaža u ART blizanačkim trudnoćama sa 18.5% nego kod njihovim spontanijama sa 12.9%, što je značajno različito ($\chi^2=7.307$, $df=1$, $p=0.007$).

Gestacija je prosečno duže trajala kod blizanačkih spontanijama sa 36.28 ± 2.80 nedelja u odnosu na ART trudnoće sa 35.87 ± 2.62 nedelje, što je visoko značajna razlika ($t=-2.659$, $df=1118$, $p=0.008$), najranije su se trudnoće završavale u 27 nedelji gestacije sve do 40 nedelja (Tabela br 13).

Više trudnoća u spontanim blizanačkim trudnoćama se završilo u terminu (nakon 37 nedelje gestacije) 56.8% za razliku od ART sa 49.6%, čija razlika pokazuje graničnu značajnost ($\chi^2=5.757$, $df=2$, $p=0.056$). Kraće od 32 nedelje gestacije je završeno 42 trudnoće (7.5%) kod ART blizanaca, a kod spontanijama 35 (6.2%).

Tabela br 13. Porodaj- gestacijska starost i način završavanja trudnoće

Karakteristika	Blizanci ART		Blizanci kontrola		Značajnost razlika	
	Broj	%	Broj	%		
Gestacijska starost, prosečna (Xsr±sd)(nedelje)	35.87±2.62		36.28±2.51		t=-2.59 p=0.008	
Vaginalni porodaj	79	14.1	223	39.8	$\chi^2=96.05$ p=0.0001	
Operativni vaginalni porodaj, forceps	3	0.5	5	0.9	p=0.478	
Carski rez	elektivni	289	60.1	186	55.2	p=0.163
	hitni	192	39.9	151	44.8	
	ukupno	478	85.4	337	60.2	$\chi^2=95.05$ p=0.0001
Epiduralna anestezija	3	3.6	14	6.2	p=0.382	
Gestacijska starost-porodaj (nedelje)	≥37ng	278	49.6	318	56.8	$\chi^2=5.757$ p=0.05
	32-36.9ng	240	42.9	207	37	
	<32ng	42	7.5	35	6.2	

Način završavanja trudnoće se razlikuje zavisno od načina nastanka trudnoće. Iako su u pitanju blizanačke trudnoće gde je povećana učestalost završavanja trudnoće carskim rezom u odnosu na jednoplodne trudnoće, uočavaju se razlike između grupa pa je carskim rezom završeno 478 od 560 ART blizanačkih trudnoća (85.4%) a kod spontanih samo 60.2% (337/560), što čini razliku veoma značajnom ($\chi^2=06.056$, df=2, p=0.000), dok je vaginalnim porođajem završeno samo 14.1% u ART grupi i 39.8% kod spontanih blizanaca.

Kod tri slučaja u ART grupi imamo kod I blizanca vaginalni porođaj, a kod drugog porođaj carskim rezom, što kod spontanih gemela nije zabeleženo, odnosno govori o ne primenjivanju operativnog vaginalnog porođaja u slučaju ART blizanaca.

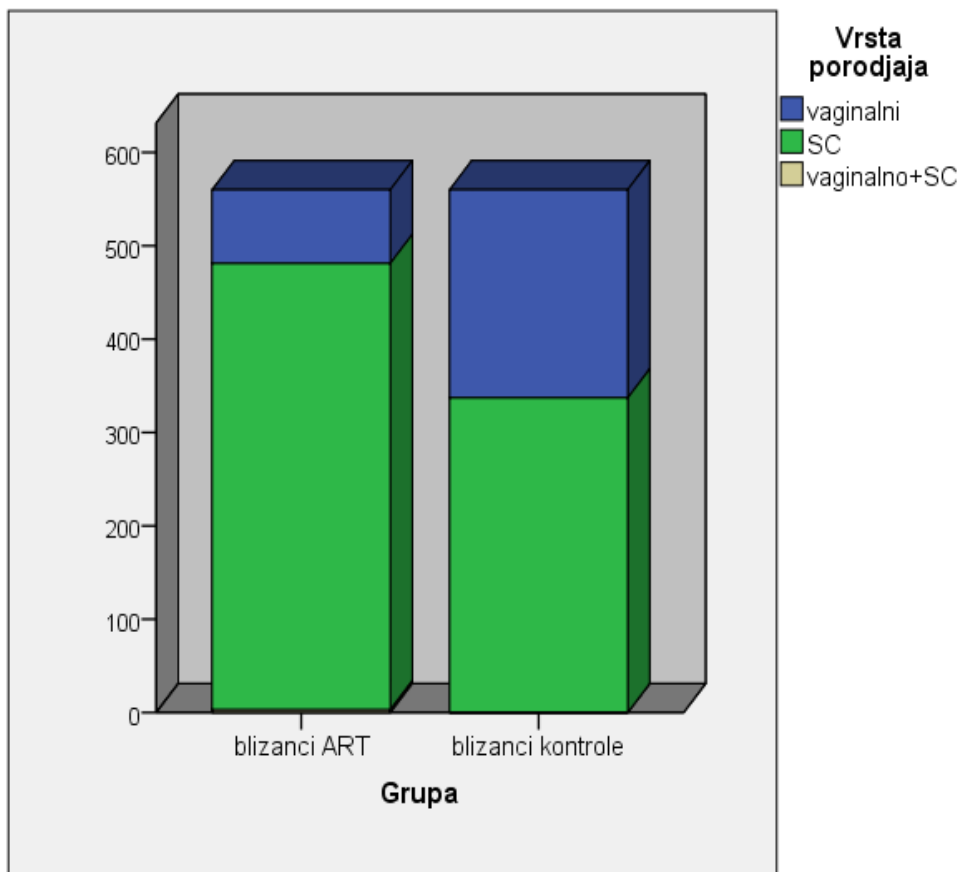
Grafikon br 15 prikazuje strukturu načina porođaja kod blizanaca.

Indikacije za carske rezove se između grupa ne razlikuju. Većina carskih rezova, nezavisno od načina postanka trudnoće su bili elektivni odnosno planirani i to 60.1% u ART grupi i 55.2% kod spontanih gemela, a odnos hitnih je u istom smislu tj 39.9% kod ART i 44.8% kod kontrola, odnosno vidimo da je više hitnih rađeno kod kontrola, ali razlika ne dostiže statističku značajnost ($\chi^2=1.946$, df=1, p=0.163).

Grafikon br 16. prikazuje strukturu carskih rezova kod blizanačkih trudnoća

Analiza vrste vaginalnog porođaja pokazuje isti protokolarni postupak sa blizancima

bez obzira na način nastanka trudnoće. U najvećem procentu imali smo stimulaciju porođaja sintocinonom 65.1% kod ART i 76.1% kod spontanih, zatim spontani porođaj 33.7% kod ART i 22.5% kod kontrola i indukciju porođaja kod 1.2% ART i 3.1% kod kontrola. ($\chi^2=5.420$. $df=4$, $p=0.247$).



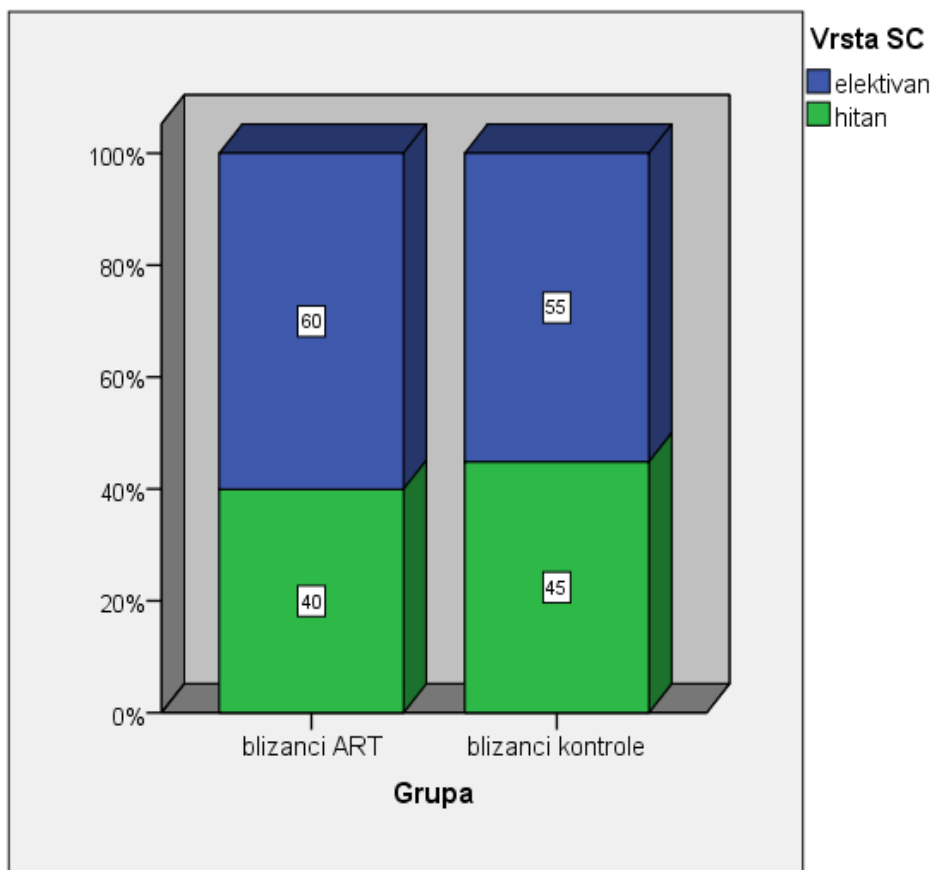
Grafikon br 15. Vrsta porođaja kod blizanačkih trudnoća

Primena operativnog vaginalnog porođaja sa aplikacijom forcepsa je retka kod blizanačkih trudnoća, i forceps izlazni po Negelu je aplikovan kod jednog blizanca u 3 slučaja (0.5%) u ART grupi i 5 slučajeva (0.9%) kod kontrola. ($\chi^2=0.504$, $df=1$, $p=0.478$).

Takođe, primena periduralne analgezije prilikom vaginalnog porođaja je retka u gemelarnim ART trudnoća sa 3 aplikacije (3.6%) i nešto češća kod spontanih sa 14 aplikacija (6.2%), ali bez značajnih razlika ($\chi^2=0.754$, $df=1$, $p=0.382$).

Prosečna telesna masa ART blizanaca je 2356.92 ± 572.27 grama i lakši su od kontrola u proseku oko 30 grama tj prosek kod spontanih je 2391.99 ± 580.22 , sa rasponom težina od 500 do 4050. grama, što nije značajna razlika u težini ($t=-1.439$, $df=2233$, $p=0.150$).

Ako telesnu masu posmatramo po kategorijama najviše beba je bilo teže od 2500 grama nezavisno od načina nastanka blizanačke trudnoće sa 522 odnosno 46.7% kod ART i 549 sa 49.1% kod spontanijih blizanaca. Ako posmatramo najugroženiju grupu prematurusa sa težinom ispod 1500 grama imamo 90 (8.1%) kod ART i 89 (8.0%) kod spontanijih. Skoro polovina beba u blizanačkim trudnoćama ima telesnu masu između 1500 i 2500 grama u obe grupe ($\chi^2=1.320$. Df=2, p=0.517).



Grafikon br 16. Indikacije za carski rez kod blizanačkih trudnoća.

Prosečna dužina blizanaca je skoro ista nezavisno da li su nastali posle ART ili spontano tj sa 46.03 ± 3.95 cm i 46.15 ± 3.92 kod spontanijih od 25 do 56cm ($t=-0.572$, $df=2233$, $p=0.452$).

Prvi blizanac je najčešće prednjačio glavicom (65.5% ART i 63.4% kontrole), zatim karlicom (27.9% ART i 28.0% kontrole) i stopalcima (3.4% ART i 2.1% kontrole), što nam govori o istom prednjaćem delu kod blizanaca generalno ($\chi^2=0.561$, $df=1$, $p=0.454$). Drugi blizanac je prednjačio takođe najčešće glavicom (50.7% kod Art i 49.8% kontrole), zatim slede karlična prezentacija sa 23.4% ART i 22.0% kontrole, pa

poprečni položaj sa 16.5% ART i 15.5% kontrola i stopalcima sa 8.4% u obe grupe. Primećujemo da se kod drugog blizanca javlja veća učestalost poprečnog položaja, ali bez značajnosti razlike ($\chi^2=0.089$, $df=1$, $p=0.765$) (Tabela br 14).

Tabela br 14. Neonatalne karakteristike kod blizanačkih trudnoća.

Karakteristika	Jednoplodne ART		Jednoplodne kontrola		Značajnost razlika	
	Broj	%	Broj	%		
prosečna telesna masa na porođaju (Xsr ±SD)	2356.92±572.27		2391.99±580.22		p=0.150	
dužina neonatusa, prosečna (Xsr ±SD)	46.03±3.95		46.15±3.92		p=0.452	
Telesna težina (gr)	>2500	522	46.7	549	49.1	p=0.517
	1500-2500	505	45.2	480	42.9	
	<1500	90	8.1	89	8	
pol	M	563	50.3	565	50.5	p=0.916
	Ž	557	49.7	554	49.5	
prezentacija I blizanca	glavica	367	65.5	355	63.4	p=0.454
	ostalo	193	34.5	205	36.6	
prezentacija II blizanca	glavica	284	50.7	279	49.8	p=0.765
	ostalo	276	49.3	281	50.2	
LGA (>90 percentila)	12	0.4	3	0.3	p=0.478	
Prosečan Apgar u I minuti (Xsr ±SD)	6.77± 2.09		7.21± 2.16		$\chi^2=4.899$ p=0.0001	
Apgar u prvom minutu <7	602	53.9	468	41.9	$\chi^2=36.887$ p=0.0001	
Mrtvorodenost	19	1.7	27	2.4	p=0.162	

Ako posmatramo ukupni odnos polova u blizanačkim trudnoćama imamo skoro jednaku zastupljenost polova sa nešto više dečaka tj 50.3% u odnosu na devojčice 49.7% nakon primene postupka IVF, isto kao i u spontanoj populaciji tj 50.5% dečaka u odnosu na 49.5% devojčica ($\chi^2=0.011$, $df=1$, $p=0.916$). Kombinacije polova u okviru jednog para blizanca su očekivane u obe grupe tj kod ART blizanca je najčešća kombinacija dva dečaka sa 52.7%, (146) zatim dve devojčice (143), a mešoviti parovi su 270, kao i kod kontrola gde je 170 parova sa dva dečaka, 169 sa dve devojčice, a kod 215 su mešoviti parovi.

Blizanci nastali nekom od metoda vantelesne oplodnje imaju značajno manju učestalost intrauterine restrikcije rasta (IUGR) ili manju telesnu masu na rođenju ispod 10 percentila očekivane za gestacijsku starost u odnosu na spontano nastale blizance, što je dosta iznenađujući nalaz (52 beba ili 4.7% u ART u odnosu na 79 beba ili 7.1% kod spontanih, što je statistčki značajan rezultat $\chi^2=6.005$, $df=2$, $p=0.05$). Makrozomija ploda je retka u obe kategorije sa 4 slučaja u ART (0.4%) i 3 kod kontrola (0.3%).

Međutim, adaptacija blizanaca na uslove spoljašnje sredine nakon porođaja je različita kod onih nakon ART i nakon spontanih trudnoća. Tabela br 15 pokazuje prosečne vrednosti Apgar skorova u blizanačkim trudnoćama u 1 minuti.

Tabela br 15. Apgar skorovi u I minuti kod blizanaca

		Apgar skor u prvom minutu					
		N	Mean	SD	Med	Min	Maks
	blizanci ART	1117	6.77	2.09	7.00	.00	10.00
Grupa	blizanci kontrole	1118	7.21	2.16	8.00	.00	10.00
	Ukupno	2235	6.99	2.14	8.00	.00	10.00

Prosečna vrednost Apgar skoro je značajno niža kod ART blizanaca sa 6.77 ± 2.09 u odnosu na spontane sa 7.21 ± 2.26 ($t = -4.889$, $df = 2233$, $p = 0.0001$).

Ako posmatramo prosečan Apgar skor nakon 5 minuta ekstrauterinog života, primećujemo da se prosečni skorovi obe grupe popravljaju, ali da razlika perzistira odnosno kontrole i dalje pokazuju bolju adaptaciju na uslove spoljašnje sredine tj 7.68 ± 1.92 prema ART sa 7.44 ± 1.85 ($t = -2.970$, $df = 2233$, $p = 0.003$) (Tabela br 16).

Tabela br 16. Apgar skorovi u 5 minuti kod blizanaca

		Apgar skor u petom minutu					
		N	Mean	SD	Med	Min	Maks
	blizanci ART	1117	7.44	1.85	8.00	.00	10.00
Grupa	blizanci kontrole	1118	7.68	1.92	8.00	.00	10.00
	Ukupno	2235	7.56	1.89	8.00	.00	10.00

Takođe, značajno veća zastupljenost Apgar skora nižeg od 7 u 1. minuti je kod ART blizanaca i to 53.9% u odnosu na 41.9% kod kontrola ($\chi^2 = 36.887$, $df = 3$, $p = 0.000$). Značajno više blizanaca u ART grupi ima Apgar u kategoriji od 4 do 7 sa 45.7% u odnosu na 34.2% kod kontrola. U grupi onih koji su živorođeni i ocenjeni najnižim ocenama od 1 do 3 ima nešto više u ART gemelima 73 (6.5%) u odnosu na 59 (5.3%) kod kontrola, što ne daje značajnu razliku.

Mrtvorodenih tj. onih sa Apgarom 0 i težih od 500 grama ima više kod kontrola i to 27 (2.4%) u odnosu na ART sa 19 (1.7%), što nema statističku značajnost ($\chi^2 = 1.959$, $df = 1$, $p = 0.162$).

Što se tiče Apgar skorova u 5 minuti, povećava se procenat popraavljenih Apgar skorova i kod spontanijh gemela i kod ART ali se zadržava razlika iz prvog minuta. Sa 46.1% na 66.0% se popravlja broj onih sa vrednostima Apgara 8-10 u ART, a kod kontrola sa 58.1% na 73.1% ($\chi^2=17.455$, $df=3$, $p=0.001$). Broj onih sa najnižim Apgarima od 1 do 3, se značajno smanjio u obe grupe, u ART sa 73 (6.5%) na 41 (3.7%), a kod kontrola sa 59 (5.3%) na 30 (2.7%), odnosno skoro polovina dece se popravila.

Frekvencija prijema u NICU neonatalnu intenzivnu negu je značajno veća kod ART blizanaca sa 210 (19.07%) u odnosu sa 169 (15.46%), ($\chi^2=5.059$, $df=2$, $p=0.02$). Međutim, prosečno su ART blizanci duže boravili u intenzivnoj nezi sa 7.83 ± 8.29 dana u odnosu na kontrole 6.80 ± 7.89 dana, uz duži interval od 1 do 59 dana odnosno skoro 2 meseca. ($U=15952$, $z=-1.702$, $df=0.089$) (Tabela br 17).

Tabela br 17 Neonatalna patologija kod blizanačkih trudnoća

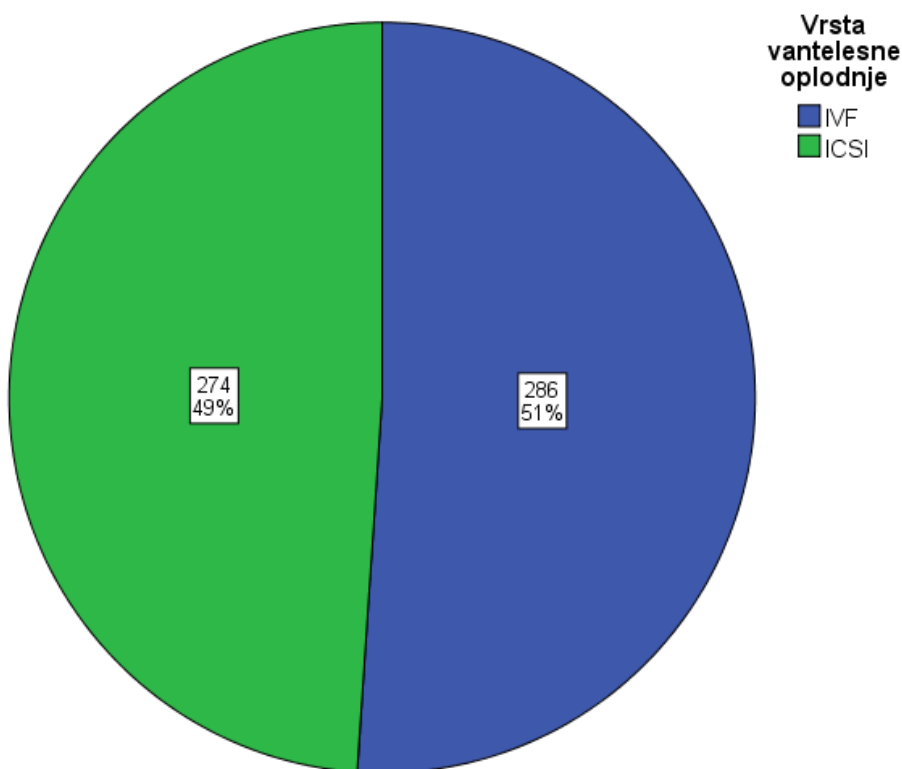
Karakteristika	blizanci ART n=1120		blizanci kontrola n=1120		Značajnost razlika
	Broj	%	Broj	%	
Prijem u NICU	210	19.07	169	15.46	P=0.02
Prosečan boravak u NICU (Xsr \pm SD) (dani)	7.93 \pm 8.25		6.80 \pm 7.89		p=0.08
Kongenitalne anomalije	38	3.4	56	5.0	p=0.073
Hromozomopatije	5	0.446	2	0.179	p=0.140
Perinatalni mortalitet	34	3.035	51	4.553	p=0.08
Neonatalni mortalitet	15	1.360	24	2.195	p=0.112

Neonatalni mortalitet se izražava kod 15/1101 živorođenje dece i iznosi 1.36% u slučaju ART blizanaca prema 24/1093 tj 2.195% kontrola, što je lošiji rezultat u spontanoj populaciji. ($\chi^2=3.290$, $df=1$, $P=0.112$). I perinatalni mortalitet govori o lošijem preživljavanju blizanaca u spontanoj populaciji sa 4.553% mortalitetom u odnosu na ART sa 3.035% ($\chi^2=3.676$, $df=1$, $P=0.08$), što je i u saglasju sa stopama mrtvorodenosti tj intrauterinog mortaliteta sa 2.4% u odnosu na 1.7% u ART.

Kongenitalne malformacije uključujući i major i minor su češće zabeležene u spontanoj populaciji blizanaca 5.0% prema 3.4% u ART, ali razlika nije statistički značajna ($\chi^2=3.209$, $df=1$, $p=0.073$).

Kod blizanaca su češće hromozomopatije nakon ART sa 5 slučajeva i to 3 slučaja Down sindroma kod ženske dece, od kojih je jedno živorođeno na zahtev roditelja, jedan slučaj 47XYY odnosno sindroma 2Y i jedan slučaj karitipa 46XY 15p+. Kod kontrola imamo dva slučaja Down sindroma kod takođe ženskih plodova. ($\chi^2=1.48$, $df=1$, $P=0.140$)

Razlike između blizanačkih trudnoća u odnosu na vrstu metode in vitro fertilizacije kojom su postignute nisu upečatljive i očekivane. U nešto većem procentu trudnoće su rezultat primene klasične metode IVF 286/560 tj 51.1% a manje ICSI metodom sa 48.9%, ali približno u istoj srazmeri (Grafikon br 17)



Grafikon br 17. Vrsta metode asistirane fertilizacije kod blizanaca

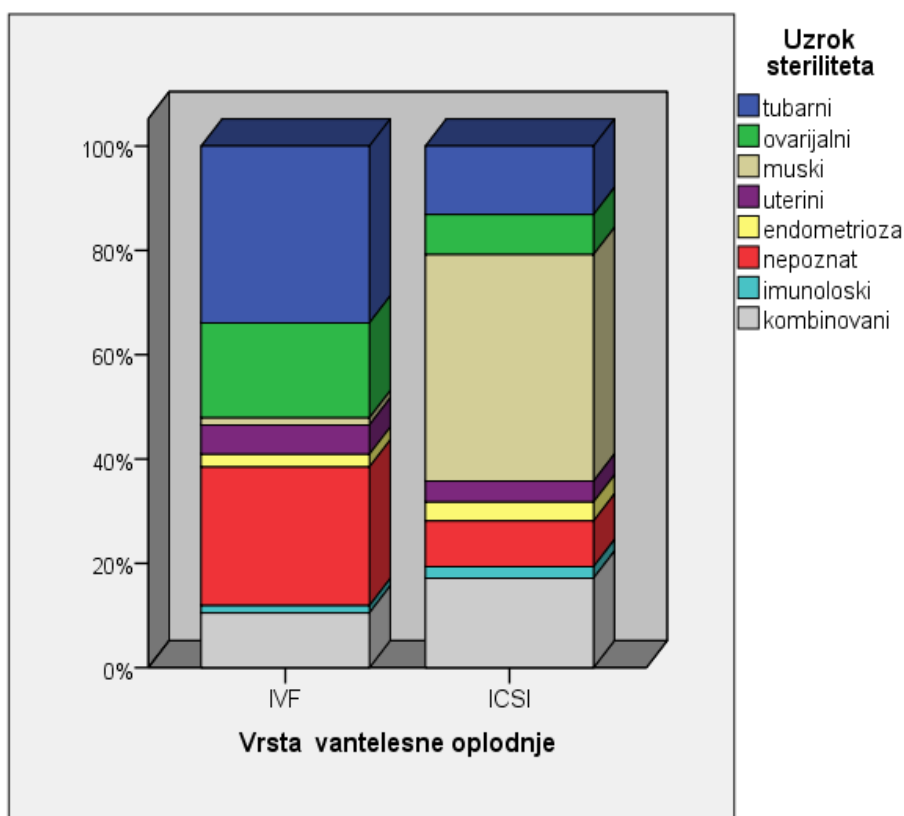
Prosečno su mlađe žene gde je primenjena ICSI metoda uspešno sa 33.82 ± 3.91 godina u odnosu na IVF sa 34.58 ± 4.20 , sa rasponom godina od 21 do 45, što je statistički visoko značajno ($t=2.211$, $df=558$, $p=0.027$).

ICSI je u većem obimu primenjivan kod žena ispod 40 godina starosti i to 52.6% kod mlađih opd 35 godina i u 41.6% u uzrastu od 35-39 godina, a IVF kod onih sa 40 i više godina 11.5% prema 6.5% ICSI. Navedene razlike pokazuju graničnu značajnost ($\chi^2=5.775$, $df=2$, $p=0.056$).

Viša ili visoka školska sprema su predominantno obrazovanje kod žena koje su uspešnu trudnoću ostvarile sa obe metode 43.7% IVF i 46.7% ICSI, a najređe su žene nisko obrazovane 14.0% kod IVF i 10.9% kod ICSI, što je bez značajnosti ($\chi^2=1.313$, $df=2$, $p=0.519$).

Žene sa blizanačkim trudnoćama nakon ART se ne razlikuju međusobno po ranijoj akušerskoj anamezi i to po graviditetu gde je 78.3% u IVF i 86.9% u ICSI grupi bez trudnoća u anamnezi (U=17775.00, z=-1.261, p=0.207), broju spontanih pobačaja sa 90.2% u IVF i 94.5% u ICSI bez spontanih pobačaja u anamnezi (U=18656.000, z=-0.366, p=0.714), prisustvu ektopičnog graviditeta sa 9.1% kod IVF i 3.3% kod ICSI (U=18857.000. Z=-0.043, p=0.966), kao ni paritetu sa 94.8% IVF bez porođaja u odnosu na 96.4% ICSI (U=17854, z=- 1.455, p=0.304).

Očekivana je razlika među faktorima steriliteta koji su uslovili primenu različitih metoda sa uspešnim rezultatom. Grafikon br 18 daje prikaz faktora steriliteta u odnosu na primenjenu metodu ART u slučaju blizanačkih trudnoća.



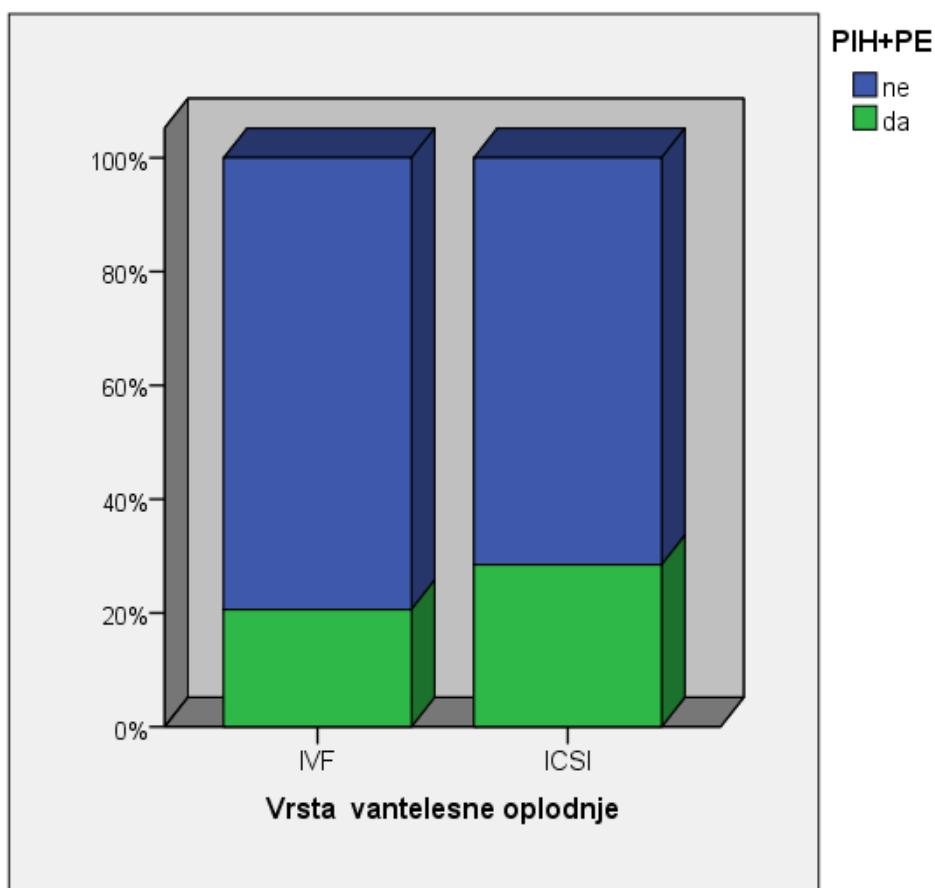
Grafikon br 18. Uzrok steriliteta i vrsta metode in vitro fertilizacije kod blizanaca

Ako uzmemo u obzir tubarni faktor infertiliteta u 72.9% je rađen IVF, a 27.1% ICSI, kod nepoznatog 76% je udeo IVF prema 24.0% ICSI, kod ovarijalnog 71.2% IVF prema 28.8% ICSI, za razliku od muškog faktora gde je odnos ICSI prema IVF 6.7% prema 3.3%, kombinovanog faktora sa 61.0% ICSI i 39.0% IVF i imunološki 60.0% prema 40.0% u korist ICSI, što je visoka značajnost razlika ($\chi^2=181.137$, df=7,

p=0.000).

Pojava maternalnih perinatalnih komplikacija je posmatrana u kategorijama hipertenzivnih poremećaja u trudnoći, gestacijskog dijabetesa, prevremene pretermijske ruptуре plodovih ovojaka, prisustva centralne placente previje, abrupcije placente, primene serklaža i invazivne dijagnostike.

Hipertenzivni poremećaji u trudnoći (uključujući PIH, PE i eklampsiju) sa javljaju češće nakon ICSI metode sa 28.5% u odnosu na 20.5% nakon IVF u blizanačkim trudnoćama, što je statistički značajno ($\chi^2=4.520$, $df=1$, $p=0.034$) (Grafikon br 19). Hellp sindrom se javlja češće nakon ICSI metode (2.18%) u odnosu na IVF sa 0.34%, ali razlika nije značajna zbog malih učestalosti.



Grafikon br 19. Hipertenzivni poremećaji kod ART blizanaca

U slučaju gestacijskog dijabetesa kod ICSI metode imamo više dijagnostikovanog poremećaja i tip A1 i A2 sa 12.5% u odnosu na 9.8% kod IVF metode, ali bez statističke značajnosti ($\chi^2=0.976$, $df=1$, $p=0.323$).

Prisustvo centralne placente previje se evidentira kod 3 slučaja nakon IVF (1.0%) i 2 slučaja nakon ICSI (0.7%), dok se abrupcija placente desila u tri slučaja nakon ICSI, ali to ne donosi značajnost u razlici ($\chi^2=3.299$, $df=2$, $p=0.192$).

Invazivna prenatalna dijagnostika se podjednako liberalno primenjuje kod blizanaca nakon ART, bez obzira na vrstu metode kojom je postignuta trudnoća 42.3% IVF i 44.9% ICSI ($\chi^2=0.380$, $df=1$, $p=0.538$). Najčešće je primenjivana genetska amniocenteza sa 34.3 % kod IVF i 33.9% kod ICSI, a najređe kordocenteza CC tri puta kod IVF (1.0%) i 3 puta kod ICSI (1.1%).

Podjednako se učestalo aplikuje serklaž u gemelarnim trudnoćama nakon ART sa 19.25% nakon IVF i 18.2% nakon ICSI, što nije statistički značajno ($\chi^2=0.089$, $df=1$, $p=0.766$).

PPROM odnosno ruptura plodovih ovojaka ispod 37 nedelje gestacije je podjednako česta kod obe metode (40/286 nakon IVF i 40/274 nakon ICSI) i to u periodu od 32 do 36.9 gestacijske nedelje sa 49.2% nakon IVF i 50.5% nakon ICSI, a manje od 32 nedelje gestacije 18.6% kod IVF i 21.4% kod ICSI ($\chi^2=0.240$, $df=2$, $p=0.887$).

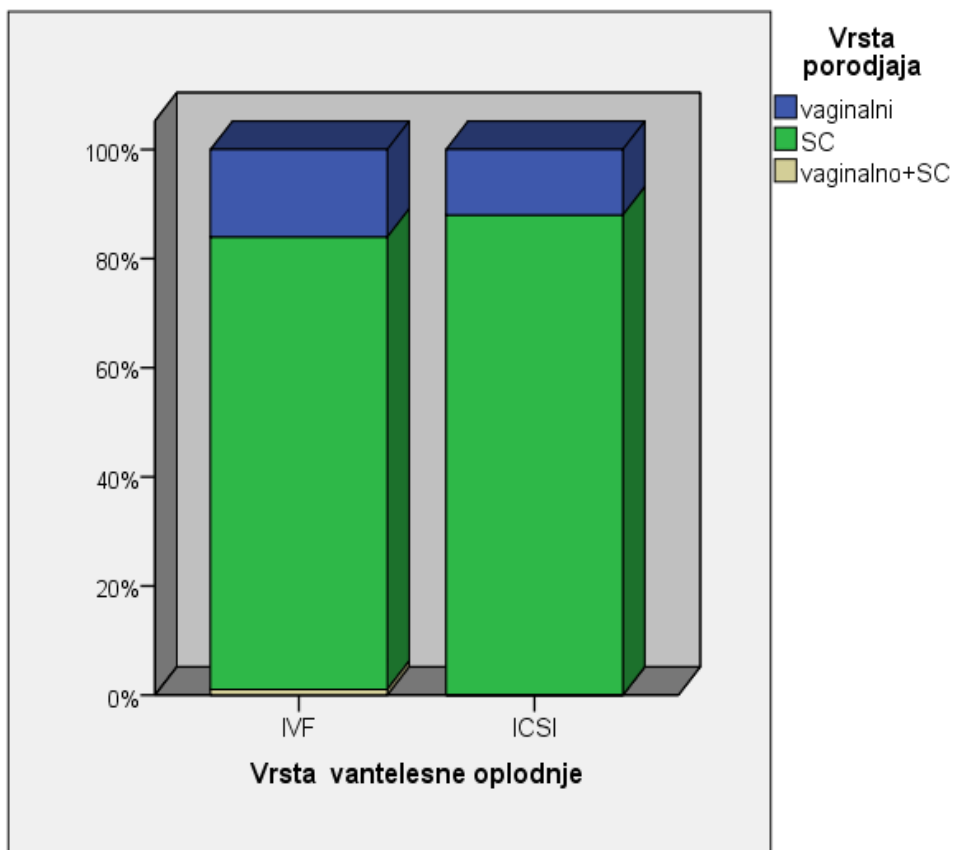
Blizanci nastali sa obe metode su se porađali prosečno u 36 nedelji gestacije tj. nakon IVF 35.84 ± 2.55 i nakon ICSI 35.90 ± 2.70 , sa rasponom od 26.20 do 40.00 nedelja, bez značajne razlike ($t=-0.258$, $df=558$, $p=0.797$).

Trudnoće blizanačke će se češće završiti porođajem u terminu ako su nastale posle ICSI 146/274 sa 53.3% u odnosu na 132/286 i 46.2%, ali isto tako će se češće završiti i pre 32 nedelje gestacije 21/274 sa 7.7% ICSI u odnosu na IVF sa 21/286 i 7.3%. Nešto više trudnoća blizanačkih nakon IVF će se poroditi između 32 i 37 nedelje gestacije sa 46.5%, a kod ICSI 39.1%. Navedene razlike postoje u različitim periodima porođaja u odnosu na gestacijsku starost, ali nisu značajne ($\chi^2=3.266$, $df=2$, $p=0.195$). (tabela br 18)

Tabela br 18. Porođaj u odnosu na vrstu metode kod ART blizanaca

		Porođaj (NG)					
		N	\bar{x}	SD	Med	Min	Maks
Vrsta vantelesne oplodnje	IVF	286	35.84	2.55	36.20	26.20	39.30
	ICSI	274	35.90	2.70	37.00	27.00	40.00
	Ukupno	560	35.87	2.62	36.50	26.20	40.00

Način porođaja se ne razlikuje kod blizanaca i ne zavisi od vrste metode ART, naime 88% ICSI blizanaca i 82.9% IVF blizanaca će biti porođeno carskim rezom. ($\chi^2=4.198$, $df=2$, $p=0.086$). Sva tri trudnoće gde imamo porođaj prvog blizanca vaginalno, a drugog carskim rezom su nastale nakon IVF (grafikon br 20).



Grafikon br 20. Vrsta porođaja zavisno od metode kod ART blizanaca

Elektivni carski rezovi sa 60.6% nakon ICSI i 59.6% nakon IVF čine veći deo carskih rezova, dok su hitni takođe podjednako zastupljene u manjem obimu ($\chi^2=0.050$, $df=2$, $p=0.823$).

Vaginalni porođaji su zastupljeni u manjem obimu sa 17.5% nakon IVF i 12% posle ICSI, pri čemu se protokol potencira stimulaciju sintocinonom sa 56.0% kod IVF blizanaca i 78.8% kod ICSI blizanaca, indukciju prostaglandinom imamo samo jedan slučaj u IVF grupi, a spontano započinjanje porođaja je češće kod IVF gemela 42.0% u odnosu na ICSI 21.2%, ali razlika nije statistički značajna ($\chi^2=4.793$, $df=2$, $p=0.091$).

S obzirom na nisku učestalost vaginalnog načina porođaja, i primena periduralne analgezije je 4.0% (2/50) u IVF grupi i 3.0% u ICSI (1/33), redak događaj, ali bez

razlike ($p=0.653$). Izlazni forceps se vrlo retko primenjuje kod blizanačkih trudnoća, pa su tako 2 slučaja nakon IVF (4.0%) i 1. slučaj nakon ICSI sa 3.0%, nedovoljna učestalost primene za tumačenje, a bez statističke značajnosti. ($p=0.653$).

Najčešće kod i blizanca prednjači glavica kod obe metode 67.5% kod IVF i 63.5% kod ICSI, zatim karlica sa 26.6% IVF i 29.2% ICSI i stopalca sa 4.2% IVF i 2.6% ICSI. ($\chi^2=0.981$, $df=1$, $p=0.322$). Presentacija drugog gemela je najčešće glavicom 55.2% IVF i 46.0% ICSI, zatim karlicom sa 21.7% IVF i 25.2% ICSI, poprečni položaj sa 14.0% IVF i 19.3% ICSI i stopalcima sa 8.4% nakon i IVF i ICSI, što se značajno razlikuje zbog znatno manjeg prednjačenja glavicom kod II blizanca nakon ICSI ($\chi^2=4.800$, $df=1$, $p=0.028$).

Podjednaka je zastupljenost polova i kod IVF i kod ICSI metode kada su u pitanju blizanci nakon ART. Nakon IVF ima nešto više devojčica 50.5% u odnosu na dečake sa 49.5%, a nakon ICSI više dečaka sa 51.1% u odnosu na 48.9% devojčica, ali bez praktične razlike, jer proporcija polova odgovara spontanoj populaciji. ($\chi^2=0.294$, $df=1$, $p=0.588$).

Što se tiče odnosa polova unutar blizanačkog para, u slučaju IVF su najčešći istopolni parovi i to kombinacija dve devojčice u 52.7% od parova gde je prvi bliznac ženskog pola, a 54.3% je učestalost kada su u paru oba dečaci, ako je prvi bliznac dečak.. Kod ICSI su blizanci istog pola u paru 48.1% ako je prvi devojčica, a 51.1% ako je prvi dečak, manje su verovatne kombinacije mešovitog pola, posebno ako je prvi bliznac dečak, nakon obe metode.

Prosečne težine blizanca nakon IVF su nešto više sa 2361.27 ± 571.29 grama u odnosu na ICSI sa 2352 ± 537.77 grama, odnosno prosečna razlika od 10 grama nije statistički značajna ($t=0.259$, $df=1115$, $p=0.796$) (Tabela br 19).

Tabela br 19. Prosečna telesna masa blizanca u odnosu na vrstu metode

		Težina blizanca					
		N	\bar{x}	SD	Med	Min	Maks
Vrsta vantelesne oplodnje	IVF	569	2361.27	571.29	2400.00	500.00	4050.00
	ICSI	548	2352.40	573.77	2450.00	500.00	3650.00
	Ukupno	1117	2356.92	572.27	2450.00	500.00	4050.00

U slučaju ako su blizanci nastali metodom IVF 55.2% (311/569) ima telesnu masu manju od 2500 grama, a kod ICSI 51.3% (238/548), s tim što u kategoriji lakših od 1500 grama ima u ICSI grupi 9.1% blizanaca, a u IVF 7.0%, ali razlika nije statistički značajna ($\chi^2=4.655$, $df=2$, $p=0.098$).

Prosečna dužina blizanaca nakon ART je skoro jednaka, bilo kojom od metoda ako su nastali. Prosečna dužina blizanca nakon IVF je 46.05 ± 3.97 cm sa rasponom od 28 do 56cm, a nakon ICSI je 46.00 ± 3.93 sa rasponom od 30 do 53 cm ($t=0.216$, $df=1115$, $p=0.829$).

Poremaćaji rasta ploda su sa podjednakom učestalošću zastupljeni u ART blizanačkoj populaciji sa 29/569 tj 5.1% nakon IVF i 23/548 i 4.2% nakon ICSI, a makrozomija ploda sa po 2 slučaja u obe grupe, bez statističke značajnosti ($\chi^2=0.510$, $df=2$, $p=0.7759$).

Prosečan Apgar skor u 1. minuti je nešto viši kod IVF blizanaca, ali bez značajnosti razlike u odnosu na ICSI blizance ($t=0.999$, $df=1115$, $p=0.318$) (Tabela br 20).

Tabela br 20: Prosečan Apgar skor u 1 minuti blizanaca zavisno od vrste metode

		Prosečan Apgar skor u prvom minutu					
		N	\bar{x}	SD	Med	Min	Maks
Vrsta vantelesne oplodnje	IVF	569	6.83	2.05	7.00	.00	10.00
	ICSI	548	6.70	2.14	7.00	.00	9.00
	Ukupno	1117	6.77	2.09	7.00	.00	10.00

Prosečan Apgapr skor u petom minuti je viši kod obe grupe blizanaca, odnosno adaptacija na uslove spoljne sredine je bolja i skoro bez razlike između IVF i ICSI metode ($t=0.530$, $df=530$, $df=1115$, $p=0.596$) (Tabela br 21).

Tabela br 21: Prosečan Apgar skor u 5-oj minuti blizanaca zavisno od vrste metode

		Prosečan Apgar skor u petom minutu					
		N	\bar{x}	SD	Med	Min	Maks
Vrsta vantelesne oplodnje	IVF	569	7.47	1.81	8.00	.00	10.00
	ICSI	548	7.41	1.89	8.00	.00	9.00
	Ukupno	1117	7.44	1.85	8.00	.00	10.00

Učestalost Apgar skora manjeg od 7 u 1 minuti kod IVF blizanaca je 53.3%, a kod ICSI 54.6%, što nije statistički značajno ($\chi^2=1.265$, $df=3$, $p=0.737$). Najviše Apgar vrednosti je u intervalu od 4 do 7 sa 45.9% u IVF grupi i 45.4% u ICSI grupi. Apgari u najlošijoj kategoriji od 1 do 3 se nalaze 34/569 kod IVF i 39/548 kod ICSI blizanaca. Mrtvorodenost je češća nakon ICSI sa 11 slučajeva (2.0%) nego nakon IVF 8 slučajeva (1.4%), ali razlika nije značajna ($\chi^2=0.113$, $df=1$, $p=0.737$).

U 5 minuti se smanjuje učestalost Apgar skora nižeg od 7 u obe grupe na 32.7% u IVF grupi blizanaca i 35.4% u ICSI blizancima sa smanjivanjem učestalosti Ap od 1 do 3 na 18/569 kod IVF i 23/548 kod ICSI ($\chi^2=1.830$, $df=3$, $p=0.608$).

Učestalost prijema u NICU odnosno neonatalnu invazivnu negu je veća kod IVF blizanaca 110/561 tj 19.60% u odnosu na ICSI blizance sa 18.62%, ali bez statističke značajnosti. Prosečan broj dana boravka u intenzivnoj nezi je duži kod ICSI blizanaca 8.77 ± 9.12 dana sa rasponom od 1 do 51 dan u odnosu na IVF blizance sa 7.16 ± 7.42 dana sa rasponom od 1 do 50 dana, pri čemu razlika nije statistički značajna ($U=5196.00$, $z=-0.694$, $p=0.487$).

Neonatalni mortalitet je veći nakon ICSI sa 10/537 sa 1.82% od IVF sa 9/561 tj 1.60%, a perinatalni mortalitet je 2.98% nakon IVF i 3.83 % nakon ICSI blizanaca.

Učestalost pojave kongenitalnih anomalija kod gemelarnih ART trudnoća je 3.33% kod IVF i 3.46% kod ICSI, znači praktično sa podjednakom učestalošću, bez značajne razlike ($\chi^2=0.019$, $df=1$, $p=0.891$).

Od 5 slučajeva hromozomopatija kod ART gemela 4 slučaja su nakon IVF (2 sindroma Down, 1 slučaj sindroma 2Y i parcijalna duplikacija 15p, a samo jedan slučaj Down sindroma je posle ICSI. Kod IVF gemela 4/569 tj 0.70 % u odnosu na 1/548 sa 0.182%.

DISKUSIJA

Prva beba Looise Brown, koja je rođena 1978. kao rezultat IVF postupka, carskim rezom u 38 nedelji gestacije, težine 2700 grama, nakon visoko rizične trudnoće komplikovane preeklampsijom majke. Slučajnost ili pravilo? (Steptoe, Edwards, 1978).

Trudnoće multiple nakon lečenja infertiliteta, posebno asistirane reprodukcije tretiraju se kao visoko rizične. Multiple trudnoće, nezavisno da li su spontane ili nakon ART, se same po sebi tretiraju kao visoko rizične od početka. Međutim, to kod jednoplodnih trudnoća nije slučaj, pa se ne jednoplodne trudnoće nakon ART nisu tretirale kao visoko-rizične.

Pojava komplikacija perinatalnih kao povišen krvni pritisak (PIH), preeklampsija, intrauterino usporenje rasta (IUGR) i antepartalnog krvarenja se češće javljaju, nego u spontano nastalim trudnoćama. Stope prematuriteta i perinatalnog intrauterinog mortaliteta su znatno veće nego u svim spontanim trudnoćama. Ove komplikacije su uglavnom pripisivane visokom udelu multiplih trudnoća, posebno višeg reda i riziko faktorima majki koje su obično starije od populacije sa spontanim trudnoćama, sa prethodnom pozitivnom anamnezom infertiliteta odnosno sa poremećajima mensesruacionog ciklusa, anomalijama materice, gojaznošću, ranijim neuspešnim trudnoćama. Smatralo se da moment same metode fertilizacije ne utiče na pojavu komplikacije već je to pripisivano gore navedenim stanjima odnosno udelu multiplih trudnoća.

Kada su prvi izveštaji o lošijem perinatalnom ishodu jednoplodnih trudnoća nakon ART u odnosu na spontanu populaciju pojavili 1985. godine (Australian in vitro fertilization Group), potencirano je da mnoštvo ovih jednoplodnih trudnoća počne kao višepodne zbog transfera većeg broja embriona i da je početna multiplost (fenomen vanishing twin) odgovorna za lošiji perinatalni ishod. Uvođenjem u praksu SET (single embryo transfer), čime se eliminiše potencijalna multiplost jednoplodnih ART trudnoća, nije dala očekivane rezultate sa smanjenjem rizika za nepovoljan perinatalni ishod.

Smatra se da je u svetu trenutno oko 72.4 miliona žena ima neku formu problema sa infertilitetom (Boivin i sar., 2007). Oko 40 miliona parova u svetu koristi neku od metoda asistirane reprodukcije i oko 12 000 dece se godišnje rodi u Nemačkoj nakon ART (Zollner, Dietl, 2013). Do sada u svetu je rođeno više od 5 000 000 dece nakon

primene postupaka neke od vrsta ART, odnosno IVF (ESHRE, 2013). Svake godine se povećava broj ciklusa urađenih IVF, kao i potreba za korišćenjem metode. Smatra se da je to dovoljno veliki broj dece da bi se uočile eventualni problemi o bezbednosti metode, perinatalni rizici, zdravlje i dugoročne prognoze ove dece, kao i eventualno komplikacije metode, ali praktično još uvek je mnogo pitanja iz ove problematike bez odgovora. Problemi sa kongenitalnim malformacijama i epigenetskim poremećajima su novo poglavlje otvoreno u ART, posebno se vezuju za primenu ICSI metode, sa sve češćim epidemiološkim izveštajima o novim slučajevima.

Međutim, primećeno je da pored multiplih trudnoća, nepovoljni perinatalni ishod imaju i jednoplodne trudnoće nakon IVF. Helmerhorst i sar., 2004. godine, zatim Jackson i sar., 2004. godine su na osnovu meta analiza, izvestili o povećanom riziku za pretermijski porođaj 32-37 ng (RR 2.04 (95% interval poverenja CI 1.80-2.32), porođaj pretermijski ispod 32 ng (Rr 3.27, CI 95% 2.03-5.28), nisku porođajnu težinu ispod 2500 grama (LBW) (RR 1.70, CI 95% 1.51-1.71), veoma nisu porođajnu težinu (VLBW) ispod 1500 grama (RR 3.00, 95% CI 2.07-4.36), kao i intrauterini usporenje rasta (SGA) sa RR 1.54 (95%CI 1.44-1.56), za učestalost carskih rezova RR 1.54 (95%CI 1.44-1.66), prijem u NICU u RR 1.27 (1.16-1.40) i perinatalni mortalitet RR 1.68 (1.11-2.55) u jednoplodnim trudnoćama nakon IVF/ICSI u odnosu na spontano začete. Helmerhorst i sar., su obuhvatili 25 studija sa 17 mačovanih i 8 sa nemačovanjem koje su obuhvatile i jednoplodne i blizanačke trudnoće, objavljene u periodu od 1985. do 2002. godine.

Novije analize o ovoj problematici pokazuju konfliktne rezultate odnosno neke navode sličan ili isti perinatalni ishod IVF/ICSI jednoplodnih trudnoća u odnosu na spontane (De Neuborg i sar., 2006; Apantaku i sar., 2008; Fuji i sar., 2010), dok druge pokazuju znatno lošiji perinatalni ishod ART beba (Pandey i sar., 2012; Sazonova i sar., 2011; Henningsen i sar., 2011).

Problemi sa tumačenjem ovoliko različitih tvrđenja sa ART populacijom su pre svega različito koncipirane studije, neadekvatne kontrolne grupe, nekontrolisanje faktora kao što su godine majke, problem infertiliteta, različite definicije kategorija (definicija kongenitalnih malformacija, antepartalne hemoragije, gestacijske starosti uključenih trudnoća, minimalna telesna masa ploda koja ulazi u definiciju mrtvorodenosti, neodvajanje jednoplodnih od multiplih trudnoća, a u nekom slučajevima male studije,

nedovoljne za zaključivanje.

Prvobitni rezultati su ukazivali na znatno lošije parametre perinatalnog i neonatalnog ishoda ART jednoplodnih beba nego savremene studije, ali moramo imati na umu i da se u postupcima asistirane fertilizacije i mnogo toga promenilo od tog vremena. Naime, promenio se koncept ovarijalne kontrolisane hiperstimulacije u ovarijalnu kontrolisani stimulaciju sa smanjenjem ukupne doze lekova za stimulaciju, uvedene su novi preparati poput GnRh antagonista, kao i smanjenjem ukupnog broja raspoloživih ćelija i samim tim embriona. Transfer embriona je pomerio težište ka transferu blastociste, što dovodi embrione do dužeg boravka u medijumima i laboratoriji sa mogućim dužim delovanjem, ali i smanjenju broja transferisanih embriona. Zatim primena krioprezervacije embriona i odloženi transferi, kao i uvođenje koncepcije SET ili DET, uz sve više primena PGD. Znatno je povišen i procenat i uspešnost ART postupaka sa neejakuliranim spermatozoidima, posebno testikularnim.

Pandey i sar., 2012. godine su uradili meta-analizu 30 studije o jednoplodnim trudnoćama nakon IVF/ICSI u odnosu na spontano začete i to 20 mačovanih kohortnih studija i 10 nemečovanih kohortnih studija. Poređene kategorije su uključivale antepartalnu hemoragiju, kongenitalne anomalije, hipertenzivne poremećaje u trudnoći, gestacijski dijabetes, PPROM, učestalost carskih rezova, LBW manje od 2500 grama, VLBW manje od 1500 grama, perinatalni mortalitet, pretermijski porođaj manje od 37ng, pretermijski porođaj manje od 32 ng, prijem u NICU, indukciju porođaja i SGA bebe. U skoro svim kategorijama je povećan rizik na nastanak u ART jednoplodnim trudnoćama u odnosu na spontane i to antepartalne hemoragije je RR (95% CI) je 2.49 (2.30-2.69), kongenitalnih malformacija RR (95% CI) 1.67 (1.33-2.09) u kategoriji hipertenzivnih poremećaja u trudnoći RR je 1.49 (1.39-1.59) kod IVF/ICSI konceptusa, RR za PPROM je 1.16 (1.07-1.26); za carski rez (elektivni i hitan) RR je 1.56 (1.51-1.60). Relativni rizik da beba iz IVF/ICSI ima manje od 2500 grama je 1.65 (95% CI, 1.56-1.75), a da da konceptus ima manje 1500 grama, RR je 1.93 (95% CI 1.72-2.17). Relativni rizik perinatalnog mortaliteta je 1.87 sa 95% CI od 1.48-2.37). Povećan rizik perinatalnog mortaliteta je figurirao u samo u mačovanim kohortnim studijama, ali kada su isključeni slučajni efekti zbog heterogenosti među studijama, povećan rizik više se nije prikazivao.

Pinborg i sar., 2013 godine su obuhvatili više od 65 tekstova u periodu od 1982. do

2012. godine o potencijalnim faktorima od uticaja na perinatalni ishod jednoplodnih trudnoća u ART pri tome ne uključujući one sa manje od 100 u uzorku, bez prisustva kontrolne grupe, kao ni one sa upotrebom sa donor oocita ili krioprezerviranih oocita. Najveći doprinos većem perinatalnom mortalitetu od početka primene metode su doprinosile multiple trudnoće sa visokim rizikom prevremenom porođaja, prematuriteta i perinatalnog mortaliteta. Vanishing twin trudnoće obuhvataju oko 10% jednoplodnih trudnoća nakon DET odnosno tranfera dva embriona takođe doprinose nepovoljnom perinatalnom ishodu jednoplodnih trudnoća. Neujednačena politika sa brojem embriona koji se transferišu dovela je i do različite frekvencije multiplih trudnoća od 38.3% u Srbiji do 5.7% u Švedskoj. Međutim, ne može se nepovoljni ishod jednoplodnih trudnoća nakon ART prevazići samo politikom SET i vraćanjem jednog embriona (Thurin i sar., 2004). Uzroci nepovoljnog perinatalnog ishoda jednoplodnih trudnoća su verovatno multifaktorijski i obuhvataju i uticaj same IVF tehnike (embrionalne kulture medijuma, vreme kulture i embrio prezervaciju), ovarijalne stimulacije (menja endokrini milje i utiče na implantaciju i placentaciju), kao i etiologija subfertilitea i roditeljske karakteristike. Zaključak je da je subfertilitet glavni riziko faktor povezan sa nepovoljnim perinatalnim ishodom ART jednoplodnih beba, koji postoji i u poređenju, čak i u odnosu na bebu iste majke koja nije nastala ART procedurom. Takođe, faktori povezani sa ovarijalnom stimulacijom ili vrstom IVF metode, takođe mogu samostalno uticati na nepovoljan ishod. Potrebna su dalja istraživanja o uticaju blage ovarijalne stimulacije na embrione boljeg kvaliteta i receptivnost endometriju, uticaj mehanizama nastanka epigenetskih mutacija kod embriona i postupaka krioprezervacije, kao i produžene kulture embriona.

U našem istraživanju za jednoplodne trudnoće nakon IVF/ICSI u odnosu na spontane dobijen je veći rizik na nastanak hipertenzivnih poremećaja u trudnoći RR 1.46 sa 95% CI (1.13-1.8760), gestacijskog dijabetesa 1.49 sa 95% CI (1.09-2.02), prevremenog porođaja manje 37 nedelje RR 1.63 sa 95% CI (1.18-2.27), PPRM od 32-37 nedelje RR 2.07, 95% CI (1.10-3.89), Carskog reza RR 2.46 sa 95% CI (2.23-2.270), aplikovanja serklaža RR 4.00 (1.75-9.11), karlične prezentacije RR 1.74 95% CI (1.20-2.51), LBW od 1500-2500 grama sa RR 1.58 sa 95% CI (1.09-2.26), Ap skorom u 1 minuti manjim od 7 RR 1.67 95% CI (1.18-2.17)., kao i u izveštaju Pandey i sar., 2012. godine. Nije dobijen povišen rizik za kategorije antepartalne hemoragije (placenta

previja i abrupcije placente), kongenitalne anomalije, perinatalni i neonatalni mortalitet, SGA i indukcija porođaja.

Populacija žena koje su ostvarile trudnoću ART pokazuje da je najviše 44.3% u dobi od 35 do 39 godina, a oko 36.5% je mlađe od 35 godina, što praktično označava stariju populaciju reproduktivnu. Prosek godina za rađanje prvog deteta uglavnom u uzorku je 35.70 ± 4.28 godina, sa rasponom od 20 do 45 godina, što navode i drugi autori u jednoplodnim ART trudnoćama. Fujii i sar., 2010, navode 36.00 ± 4.00 godina. Većina istraživanja navode mlađe žene sa ART jednoplodnim trudnoćama u trenutku porođaja van Heesch i sar., 2014. prosek 33.9 ± 3.9 godina sa 82.0% žena ispod 38 godina, Dhont i sar., 1997 sa 31.3 ± 3.9 godina i 16.4% starijih od 35 godina sa rasponom od 21 do 40 godina. Sazonova i sar., 2011. su naveli 33.7 godina sa 23.9% iznad 37 godina, ali većina je uzela gornju granicu 40 godina.

Malo podataka daje većina studija o obrazovanju žena koje se podvrgavaju postupku ART. Naime, da li obrazovanje sigurno utiče na dostupnost zdravstvene službe i lečenje infertiliteta i u našem istraživanju 46% žena ima visoko ili više obrazovanje, a oko 40% srednje. Većina studija daje podatke o socio-ekonomskom statusu, van Heesch i sar., 2014 sa 76.8% srednjeg socio-ekonomskog statusa, i vrsti osiguranja privatno sa 72.4%, državno sa 29.6% prema Fernandu i sar., 2012.

Najviše žena u ART postupcima su prvorođene u našem istraživanju 94.8% žena sa jednoplodnim ART trudnoćama, ali sa 80.9% ukupnog broja bez bilo koje vrste trudnoće u anamnezi. Naime, spontane pobačaje ima 9.9% žena, a ektopični graviditet 5.8%, što govori o sveukupnom neuspehu reprodukcije, i znatno je više nego što srećemo u populaciji spontanih jednoplodnih trudnoća.

Većina autora navodi visok stepen nulipariteta u ART jednoplodnim trudnoćama Dhont i sar., 1997, sa 75.9%, Van heesch i sar., 2014., navode 69.2% nulipara, Fernando i sar., 2012. godine, 84%, Pinborg i sar. 2010, 72.2% nulipariteta, Henningsen i sar., 2011, sa 67% nulipariteta, ali bez navođenja anameze spontanih pobačaja ili ektopičnog graviditeta. Poikkeus i sar. 2007 godine navode prosečne godine 34.2 sa rasponom od 23 do 42 godine sa anamnezom gde je 58% imalo prethodne trudnoće, od toga 19.6% spontanih abortusa i 10.0% ektopičnog graviditeta u anamnezi, što je znatno više nego u našoj ART jednoplodnoj populaciji, ali na manjem uzorku od 499 žena.

Faktori steriliteta koji su bili indikacija za IVF su vodeći tubarni faktor sa 26%, zatim

sledi muški sa 20.8%, nepoznat sa 18.7%, ovarijalni sa 12.9% i kombinovani sa 12.4%, odnosno udeo ženskog je 47.3%, muškog 20.8%, kombinovanog 12.9% i nepoznatog 18.7%. Primećujemo znatno veći udeo ženskog od muškog faktora infertiliteta, ali i dosta veći procenat nepoznatog uzroka infertiliteta u našem istraživanju. Pinborg i sar., 2004. godine navode 49.6% tubarni faktor, zatim muški sa 31.7%, nepoznati sa 15.8%, ovarijalni sa 9.7%, primećujemo isti raspored učestalosti kao u danskoj studiji kada su u pitanju jednoplodne IVF/ICSI trudnoće, posebno u slučaju nepoznatog i ovarijalnog faktora.

Od maternalnih komplikacija u trudnoći većina istraživača navodi kategorije hipertenzivnog poremećaja u trudnoći (gestacijska hipertenzija (PIH), preeklampsija, eklampsija), gestacijskog dijabetesa, antepartalne hemoragije (centralna plaventa previja i abrupcija placentae), PPRM ispod 37 nedelje gestacije, potrebe za aplikovanjem serklaža i cervikalna inkompetencija, malprezentacija fetusa u kategoriji ART jednoplodnih trudnoća.

Oko 10-15% trudnoća je komplikovano hipertenzivnim poremećajima u trudnoći odnosno PIH i preeklampsijom (PE), što ih čini najvažnijim uzrokom maternalnog i neonatalnog morbiditeta i mortaliteta (Schutte i sar., 2008). Neke studije navode da u slučaju IVF trudnoća, rizik razvoja PIH je dva puta veći (Allen i sar., 2006), a preeklampsije 2.7 puta (Shevell i sar., 2005), ne samo zbog starijih godina i nulipariteta, već i abnormalne placentacije (Mamman i sar., 1998).

Sa etiologijom PIH i PE u spontanoj populaciji još uvek nepoznata, se povezuje abnormalna placentacija, sa posledicom smanjene placentae perfuzije i placentne ishemije. ART dodatno doprinosi i placentacijom u suprafiziološkom endokrinom miljeu u uslovima kontrolisane ovarijalne stimulacije i njenog uticaja na endometrijum. (Lambers i sar., 2009).

U našem istraživanju 14.8% hipertenzivnih poremećaja u trudnoći kod ART jednoplodnih trudnoća u odnosu na 10.1% u spontanoj populaciji, je statistički visoko značajna razlika. Ako uporedimo kategorije PIH, značajnost razlike se održava 12.9% prema 8.0%, dok kod preeklampsije nemamo značajnu razliku učestalosti u odnosu na spontanu populaciju 1.9% prema 1.1%. Studije mačovane kohortne koje navode slične rezultate su Koudstaal i sar., 2000. godine, sa 13.7% hipertenzivnih poremećaja, Delgadillo i sar., 2008, sa 15.38%, Tan i sar., 1992, sa 13.9% ali i uključenim

trudnoćama završenim nakon 28 nedelje gestacije.

Gestacijski dijabetes se značajno češće javlja u ART jednoplodnim trudnoćama sa 12.3% u odnosu na spontanu populaciju 8.6% u našem istraživanju ($p=0.006$). Poremećaji glukozne regulacije u trudnoći se javljaju u 3-10% slučajeva. Oko 80% poremećaja otpada na gestacijski diabetes melitus i sastoji se od relativno kratkih epizoda hiperglikemije, ali sa velikom implikacijom sa fetalnim i neonatalnim morbiditetom. Kod dece dijabetičnih majki imamo dva puta veći rizik od povrede neonatusa tokom porođaja, 3 puta veću verovatnoću da će trudnoća biti završena carskim rezom i četiri puta veću incidencu prijema u NICU (Moore T, 1999). Riziko faktori su starije žene (više od 30 godina), gojaznost, porodično opterećenje, kao i prisustvo insulinske rezistancije u sklopu sindroma PCOS u infertilitetu.

Poikkeus i sar., 2007 nalaze u ART jednoplodnim trudnoćama 10.4% gestacijskog dijabetesa nakon SET, 7.4% nakon DET za razliku od 6.1% u spontanoj populaciji. S obzirom na veću učestalost starije populacije i zastupljenost ovarijalnog faktora u infertilitetu, uz incidencu gojaznosti u populaciji, verovatno je razlog učestalosti ne sam postupak IVF, već faktori koji su vezani za infertilitet i eventualni poremećaj glukozne tolerancije.

Preвременa preterminska ruptura plodovih ovojaka PPRM ispod 37 nedelje gestacije se definiše kao narušavanje integriteta ovojaka u odsustvu materičnih kontrakcija. PPRM se češće dešava u ART jednoplodnim trudnoćama i to u periodu od 32 do 37 nedelje gestacije sa 3.3% u odnosu na 1.6% kod spontane populacije ($p=0.02$). U periodu gestacije manjem od 32 nedelje, postoji više slučajeva u spontanoj populaciji sa inače malim frekvencijama, pa je navedena razlika verovatno posledica slučajnosti.

Rezultati velikih studija i metaanaliza nisu pokazali da postoji povišen rizik za PPRM kod jednoplodnih IVF/ICSI konceptusa (Pandey i sar., 2012; Helmerhorst i sar., 2004). Studije Delgadillo i sar., 2006., i Apantaku i sar., 2008., su naveli istu definiciju PPRM kao i našoj studiji. Tomic, Tomic, 2011., su naveli 13.1% PPRM u IVF/ICSI populaciji prema 9.9% u spontanoj populaciji kod žena starijih od 35 godina. Učestalosti slične našima navode Poikkeus i sar., 2007., sa 0.7% nakon SET i 1.7% nakon DET u odnosu na spontanu populaciju sa 0.35, ali bez značajnosti razlike.

Jednoplodna trudnoća nakon ART je u 83.3% bila završena Carskim rezom, za razliku od kontrola gde je 66.1% završeno vaginalnim putem ($p=0.000$), odnosno RR je 2.45 sa

95% CI(2.23-2.70). Ovako visok procenat carskih rezova za jednoplodne trudnoće u spontanoj populaciji tj. 33.9% je već godinama konstantan za Kliniku. Međutim, u strukturi carskih rezova kod obe populacije dominiraju elektivni Carski rezovi sa 72-4% nakon IVF/ICSI u odnosu na 63.2% u spontanoj populaciji, odnosno udeo hitnih je sličan sa 27.% kod IVF/ICSI grupe prema 36.8% u spontanoj jednoplodnoj populaciji.

Većinski deo IVF/ICSI jednoplodnih trudnoća se završava carskim rezom i to Tomic, Tomic, 2011. godine, navode 39.9% carskih rezova kod ART jednoplodnih u odnosu na 25.1% kod spontanih, sa odnosom elektivnih 24% prema 11.7%, i hitnih 15.9% prema 13.4% kod spontanih, odnosno sa visoko značajnom razlikom u učestalosti carskih rezova i to elektivnih u korist ART ($p=0.001$). Najveća razlika u indikacijama za carske rezove je u kategoriji na lični zahtev majke i to obično u terminu, u slučaju izostanka spontanog započinjanja porođaja. Davies i sar., 2012., navode 36.4% carskih rezova kod ART jednoplodnih trudnoća u odnosu na 22.9% kod spontanih jednoplodnih ($P=0.001$), a Wennerholm o sar., 2013., navode 22.6% carskih rezova kod IVF/ICSI jednoplodnih u odnosu na 15.4% spontanih jednoplodnih.

U našem istraživanju visoka učestalost carski rezova i to u korist elektivnih pored činjenice u povećanoj učestalosti porođaja ispod 37 nedelje i prematuriteta odnosno težine ispod 2500 grama LBW, ne može u potpunosti da objasni ovakve nalaze. Naime, očigledno postoji poseban tretman od strane ginekologa i odnos prema jednoplodnim ART trudnoćama, odnosno oklevanje da se sačeka započinjanje vaginalnog porođaja u ovakvim slučajevima, kao i da se primenjuje indukcija porođaja ili operativno tj. instrumentalno završavanje vaginalnog porođaja. Helmerhorst i sar., 2004., u metaanalizi navode RR za carski rez 1.54 (95% CI od 1.44-1.66) u mačovanim studijama (Koudstal i sar., 2000), a 2.33 (95% CI 1.95-2.79) u nemečovanim kod jednoplodnih IVF/ICSI trudnoća.

Ukoliko se u slučaju ART jednoplodne trudnoće opredelimo za vaginalni porođaj, mnogo češće indukujemo porođaj prostaglandinom nego u spontanoj populaciji 15.0% u odnosu na 7.5% ($p=0.026$). S obzirom na mali broj ART trudnoća koje su završavane vaginalnim putem, indukcija porođaja prostglandinom čini 24/160 trudnoća, a inače kada je u pitanju vaginalni porođaj nije bilo razlike u načinu vođenja porođaja tj. 11.2% u ART i 10.9% populacije je započeto spontano, a 71.2% Art i 79.8% kontrola je stimulisano sintocinonom, što praktično znači da nema razlike u odnosu lekara prema

vaginalnom porođaju, zavisno od načina nastanka trudnoće.

Prosečno trajanje gestacije odnosno vreme porođaja je kraće u ART jednoplodnim trudnoćama sa 38.14 ± 1.82 nedelja u odnosu na spontane trudnoće sa 38.65 ± 1.72 dana, što je statistički značajno ($p=0.01$). Klinička značajnost ove razlike je ograničena, s obzirom da su se obe vrste trudnoća završile u 39 nedelji gestacije odnosno u terminu. Tomic, Tomic 2011., godine navode istu gestacijsku starost ART jednoplodnih trudnoća sa 38.3 ± 1.9 dana u odnosu na 39.2 ± 2.1 kod spontanih jednoplodnih ($p=0.876$), Van Heesch i sar, 2014., navode 39.4 ± 2.0 nedelja kao gestacijska starost jednoplodnih trudnoća nakon IVF/ICSI na porođaju, Pinborg i sar., 2010. vreme završavanja trudnoće je 39.24 ± 2.28 kod IVF/ICSI jednoplodnih prema 39.87 ± 1.85 ($p=0.01$).

Porođaj pre 37 nedelje gestacije ima dva puta veći rizik pojave kod ART jednoplodnih trudnoća nego kod spontano začetih. U ART grupi 9.8% trudnoća se završili pre 37 nedelje gestacije, a kod kontrola 6.1%, što je visoko statistički značaj rezultat ($p=0.01$) sa RR 1.64 i 95% CI (1.17-2.274). Ako podelimo periode od 32 do 37 nedelje gestacije i ispod 32 nedelje gestacije primećujemo da ispod 32 nedelje gestacije se završilo više trudnoća u ART grupi 18/881 nego kod kontrola 12/881, ali razlika ne dostiže značajnost. Međutim, od 32 do 37 nedelje gestacije u ART grupi se završilo 7.8% trudnoća, a kod spontanih jednoplodnih 4.7%. ($p=0.011$). Relativni rizik porođaja 32-37 nedelje gestacije kod ART jednoplodnih je 1.68 sa 95% CI (1.566-2.4487) u odnosu na spontane jednoplodne trudnoće.

Totalni prevremeni pretermijski porođaji čine 22.9% kod ART jednoplodnih ako su majke starije od 35 godina u odnosu na 13.8% spontanih po Tomic, Tomic, 2011. godine. Poikkeus i sar., 2007 navode proporcije sličnije našima sa 11.2% nakon SET i 10.0% nakon DET jednoplodnih trudnoća u odnosu na 3.7% spontanih. Pinborg i sar., 2014. navode na IVF/ICSI uzorku od 9480 žena 9.3% prevremenog porođaja manje od 32 do 37 nedelje gestacije u odnosu na 4510 spontanih jednoplodnih sa 4.7%. Fedder i sar., 2013. koji su istraživali perinatalni ishod ART dece nakon različite metode ART (IVF, ICSI sa ejakulatom i ICSI sa testikularnim spermatozoidima) navode prevremene porođaje manje od 37 nedelje gestacije sa 7.1% u ICSI sa ejakulatom jednoplodnima, 9.1% IVF jednoplodnima, 5.2% ICSI sa testikularnim spermatozoidima i 4.6% u spontanoj pupaciji, što je u saglasju na našim rezultatima.

Pretermijski porođaj od 32-36.9 nedelje gestacije u meta analizi Helmerhorsta i sar.

2004., ima u kohortnim mačovanim studijama u intervalu od 6.5 do 9.2% u ART grupi u odnosu na 3.8 do 7.6% sa RR 2.05 (1.71-2.47) (Koivurova i sar., 2002, 10/153 sa 6.53% u odnosu na 4.53% (13/287) sa RR 1.44, 95% CI (0.64-3.21), $p=0.3694$; Petersen i sar., 1995).

Više kohortnih studija mačovanih je pokazalo rezultate slične za prevremeni porođaj manji od 37 nedelje gestacije našima Koivurova i sar., 2002. sa 13/153 tj. 8.5% u odnosu na 16/287 tj. 5.6% i sa RR 1.52 (95% CI 0.75-3.08), Petersen i sar. 1995. sa 7.1% (5/70) u odnosu na 4.3% (3/70) i RR 1.67 (95% CI 0.41-6.71). Totalni nalaz 12 mečovanih studija u okviru metaanalize Helmerhorsta i sar., 2004. godine su pokazale nalaz ukupno 11.4% (613/5361) prevremenog porođaja jednoplodnih manje od 37 nedelje gestacije IVF/ICSI trudnoća u odnosu na 6.1% (428/7038) spontanih sa RR 2.04 (1.80-2.32). Jednoplodne trudnoće nakon ART, praktično pokazujući duplo veći rizik prevremenog porođaja manjeg od 37 nedelje gestacije.

Studije, Dhont i sar., 1999; Dhont i sar, 1997.; zatim Koivurove i sar., 2002, mačovane kohortne navode učestalost porođaja pre 32 nedelje gestacije 63/3048 sa 2.1% prema 0.3% spontanih (8/3048) sa RR 7.88 (3.78-16.4), zatim 1.3% (4/311) prema 18/622 (2.9%) sa RR 0.44 (0.15-1.30) i 2.0% prema 1.0% i RR 1.88 (0.38-9.18).

Prosečna težina novorođenčeta iz ART jednoplodne trudnoće je oko 100 grama manja nego kod spontanih jednoplodnih trudnoća tj 3198.37 ± 596.11 grama kod ART u odnosu na 3308.27 ± 551.58 grama sa većim rasponom od 600-5300 grama. Davies i sar., 2012. godine navode u okviru velike australijske studije na 6163 konceptusa nakon ART presečnu težinu jednoplodnih sa 3259 ± 641 grama u odnosu na spontane sa 3399 ± 553 grama ($p < 0.001$), odnosno teži za 136 grama u proseku. Wennerholm i sar., 2013. godine navode prosečnu težinu nakon ART 3419 ± 636 grama u odnosu na spontane konceptuse 3505 ± 569 grama koji su teži u proseku 86 grama teži, a jednoplodne nakon FET 3552 ± 635 , koji su čak teži i od spontanih konceptusa. Prosečnu težinu od 3427 ± 601 grama kod jednoplodnih nakon SET navode Sazonova i sar., 2011., nakon različitog ET 3426 ± 619 , nakon DET 3460 ± 609 grama i nakon DET sa vanishing twinom 3360 grama ± 619 , odnosno prosečnu 3435 grama ± 607 , što je značajna razlika prosečne težine zavisno od broja vraćenih embriona sa ishodom jednoplodne trudnoće.

Pinborg i sar., 2014. su nakon ART sa svežim transferom objavili težinu jednoplodnih beba 3387 ± 634 u odnosu na 3544 ± 565 kod spontanih trudnoća sa razlikom od 157

grama. Primetno je da su ART deca iz jednoplodnih trudnoća sa manjom telesnom težinom od spontanih parknjaka, ali i da razlika u telesnoj težini beba varira zavisno da li je u upotrebi transfer zamrznutih embriona, kao i broj transferisanih embriona. Pandey i sar., 2012. godine su na rezultatima 14 studija objavili razlika prosečne telesne mase jednoplodnih nakon ART u odnosu na spontane manja 149.33 grama (95% CI 161.91 gram do 136.74 grama). Rezultate slične našima naveli su i Ochsenkuhn i sar., 2003, sa prosečnom razlikom srednjih težina od 101 gram u korist spontanih jednoplodnih (3070 grama \pm 743 kod Art u odnosu na 3.172 \pm 702 kod spontanih), Verlaenen i sar., 1995. sa 140 grama lakšim ART conceptusima, i Koivurova i sar., 2002 godina sa razlikom u masi 119 grama.

Ako jednoplodne bebe nakon ART posmatramo u svetlu populacije sa manjom telesnom masom od 2500 grama, u našem istraživanju je to 86/881 tj 9.8% u odnosu na 53/881 tj 6.0% sa RR 1.62, 95% CI (1.1674-2.2554) i $p=0.004$). Više dece u spontanoj populaciji je teže od 2500 grama 94%, dok kod ART 90% ($P=0.013$). Helmerhorst i sar., 2004. navode rezultat za RR mačovanih studija 1.50-1.92 sa prosekom RR 1.70, a kod nemečovanih RR 2.58 (1.80-3.68), a Pandey i sar., 2012. godine relativni rizik za težinu ispod 2500 grama 1.65 (1.56-1.76).

Ako težinu ispod 2500 grama podelimo u kategorije od 1500-2499 grama i ispod 1500 grama, postaje jasno da je razlika u ovoj kategoriji na račun grupe srednje malih težina LBW od 1500 do 2500 grama. Naime, ispod 1500 grama koja je najrizičnija grupa, sa prematuritetom i preživljavanjem u ART grupi imamo 15 (1.7%) u odnosu na 8 (0.9%) dece kod kontrola ($p=0.1486$, RR 1.8750). Drugi autori prijavljuju značajno više VLBW ispod 1500 grama nakon ART Pandey i sar., 2012. godine RR 1.93 (1.72-2.17) na sa apsolutno uvećanim rizikom od 9% za rađanje deteta lakšeg od 1500 grama nakon ART. Poikkeus i sar., 2007. navode 1.1% VLBW tj lakših od 1500 grama nakon SET, 0.9% lakših jednoplodnih nakon DET i 0.6% u spontanoj kohorti jednoplodnih trudnoća, što odgovara našem istraživanju ali bez značajnosti.

Rizik rađanja deteta sa telesnom masom od 1500 do 2500 grama nakon ART je povišen tj RR 1.58 (95% CI 1.099-2.2651) $p=0.013$ u našoj populaciji odnosno 8.1% prema 5.1% kod kontrola ($p=0.013$). Poikeus i sar., 2007 navode 4.5% LBW nakon SET, 8.7% nakon DET i 2.4% u spontanoj populaciji jednoplodnih beba. Pinborg i sar., 2004. navode na 8602 dece nakon IVF i ICSI u Danskoj kod jednoplodnih učestalost LBW

4.4%, dok Dhont i sar., 1997. objavljuju 6.1% LBW nakon ART u odnosu na 8.4% kod spontanih kontrola. Vidimo, da je učestalost dece nakon ART sa telesnom masom od 1500-2500 grama, dosta dva puta veća od ostalih istraživanja, ali je i nalaz naše spontane populacije skoro dva puta veći o drugih.

Smatramo da je rizik učestalosti rađanja deteta nakon ART koje je teško 1500-2500 grama rezultat povećane učestalosti i prevremenih porođaja u istoj gestacijskoj starosti (32-36ng), PPRROM i nižeg Apgar skora, s obzirom da nema razlike u učestalosti SGA (small for gestation age) u odnosu na spontanu populaciju (3.6% nakon ART prema 3.4% kod spontanih jednoplodnih, $p=0.899$). Prisustvo PPRROM, komplikacija trudnoće u vidu hipertenzije i gestacijskog dijabetesa ukazuje je da je veća učestalost telesne mase od 1500-2500 grama zapravo rezultat funkcije preterminskog porođaja od 32-36 nedelje gestacije, a ne nezavisan faktor za sebe. Tendencija prematuriteta i preterminskog prevremenog porođaja očito konfigurira kod ART jednoplodnih trudnoća, ali u kategoriji srednje ozbiljne težine odnosno od 32-36 nedelje gestacije i telesne mase 1500-2500 grama. U kategoriji izraženog prematuritetat tj težine ispod 1500 grama i rođenja ispod 32 nedelje gestacije ne nalazimo povećan rizik pojavljivanja nakon ART, ali ni povećana učestalost porođaja ispod 32 nedelje, PPRROM u toj gestacijskoj starosti ni povećavanja ozbiljnih komplikacija trudnoće sa PE, eklampsijom, Hellp sindromom, ozbiljnim formama gestacijskog dijabetesa koji bi indikovale jatrogeno završavanje trudnoće preterminsko.

Shih i sar., 2008. su dali uporedne preglede prosečne telesne mase nakon IVF i ICSI kod jednoplodnih trudnoća u odnosu na spontanu populaciju uz kategorije prosečne gestacije, % LBW ispod 2500 grama i preterminskih porođaja ispod 37 nedelje gestacije nakon IVF 3166 grama \pm 676 grama, 11.7% LBW, prosečna gestacija 38.8 \pm 2.7 nedelja i procenat porođaja ispod 37 nedelje 12.5%, nakon ICSI jednoplodne prosečna težina 3206 \pm 697 grama, LBW sa 11.5%, prosečna gestacijske starost 38.8 \pm 2.9 i preterminski porođaj sa 11.9% u odnosu na spontanu populaciju sa prosečnom težinom 3341 \pm 634, 7.1% LBW, prosečna gestacijska starost 39.3 \pm 2.7 i učestalost pretermisklog porođaja 8.6%, što je u saglasju sa našim rezultatima. Ispitali su razlike u odnosu svežih ciklusa sa ET u odnosu na FET cikluse i spontanu populaciju sa zaključkom da fetusi nakon svežih transfera imaju 3.3% nižu prosečnu težinu, OR 1.9 da će biti mase manje od 2500 grama, imaju 1.7 dana kraću prosečnu gestaciju i Or 1.4 da će biti rođeni pre 37

nedelje gestacije. Faktori koji utiču na fetalni faktori kao što su pol i prisutvo anomalija određuju dužinu gestacije, a maternalna masa utiče na težinu ploda na rođenju. Od svih mogućih riziko faktora samo dva su nađena od uticaja na pojavu niske porođajne težine su svež embriotransfer u ART vreme ART tj 1993. godina. Naime, vreme pre 1993. godine sa još nesavršenim procedurama ART i prisutnim svežim embriotransferima je rezultovalo znatno niži masama fetusa u ART nego danas kod jednoplodnih trudnoća, gde trend postoji, ali sa znatno manjim udelom.

Klemetti i sar., 2002. godine navode sniženje OR za jednoplodne trudnoće u Finskoj u periodu 1991-1993. godina OR 2.4 (95% CI 1.9-3.1) na 1.7 (95% CI 1.4-2.1) za LBW u periodu od 1998-1999. u poređenju sa spontanim jednoplodnim trudnoćama. Da li objašnjenje leži u činjenici u promeni lekova za stimulaciju i protokola, ultrasonografski nadziranim transferima. Istovremeno, u opštoj populaciji su stope prilično stabilne u periodima do 1993. godine i nakon toga sa prosečnom masom od 3385 do 3399 grama i niske mase porođajne između 4.5% i 5.1% u državi Viktorija sa 50 000 porođaja godišnje jednoplodnih.

Kod devojčica nakon ART postoji znatno više onih sa telesnom masom od 1500-2500 grama 46/404 tj 10.0% u odnosu na spontanu populaciju devojčica 19/409 sa 4.4%, kao onih lakših od 1500 grama 2.0% prema 0.2% ($p=0.000$), dok kod muškog pola nema razlike u učestalosti LBW i VLBW. Praktično, ako je devojčica iz ART ima veći rizik telesne mase manje od 2500 grama, dok kod dečaka nema rizika zavisno od pola, odnosno podjednako su teški ne zavisno da li su iz Art ili spontane trudnoće. Druga istraživanje ne navode strukturu po polu, zavisno od telesne mase u uzorcima, pa nismo mogli da uporedimo nalaze.

Ni ostala istraživanja ne prijavljuju povećanu učestalost intrauterinih poremećaja rasta prevashodno IUGR odnosno intrauterine restrikcije rasta kod jednoplodnih ART trudnoća (Isakkson i sar., 2002. sa 2.89%, Sazonova i sar., 2011. sa 3.24% u odnosu na spontanu populaciju). Suprotno, mali broj studija sa definicijom SGA kao manjim rastom od 10 percentila su prijavile 16.28% Koudstaal i sar., 2000. godine , 12.69% Reubinoff i sar., 1997 ali sa brojem ispitanika manjim od 300. Pandey i sar., 2012. godine ne navode značajan povišen rizik za nastanak SGA nakon ART RR 1.39 (1.27-1.52).

Prosečni Apgar skor u 1 minuti je značajno niži kod ART bebe sa 8.25 ± 1.56 u odnosu

na spontanu jednoplodnu bebu sa 8.52 ± 1.28 ($p=0.000$), ali klinički su obe grupe iznad 8, pa to praktično ne znači bitnu kliničku razliku, kao i učestalost terapijskih postupaka i eventualno prijem u NICU. Ali s obzirom na veću učestalost prevremenog porođaja ispod 37 nedelje gestacije, kao i telesne mase manje od 2500 grama, očekivana je i manja prosečna ocena po Apgaru kod ART jednoplodnih beba. Nakon 5 minuta života prosečna vrednost Apgar skora se praktično izjednačava sa 8.56 ± 1.37 kod ART jednoplodnih trudnoća prema 8.67 ± 1.13 kod spontanih jednoplodnih. Kod ART neonatusa vidimo popravljajanje i porast prosečnog Apgar što govori o boljem uspostavljanju homeostaze i bolje adaptacije nakon 1. minuta, dok se kod spontanih jednoplodnih Ap skor samo neznatno popravio, što govori o smanjenoj adaptaciji Art neonatusa u 1. minuti.

Veći broj dece u ART grupi je ocenjen Apgar skorom manjeg od 7 u 1 minuti je nego u spontanoj populaciji 14.1% u odnosu na 9.5% ($p=0.01$). Međutim, nakon 5 minute, dolazi do ukupnog smanjenja broja dece sa Apgarom manjim od 7, ubedljivije u ART grupi 6.7% prema 5.7%, odnosno da je znatno veći broj dece iz Art grupe se bolje adaptirao i skoro izjednačio broj dece u obe grupe koji su u 5 minuti ocenjeni sa manje od 7. Najveća razlika i poboljšanje adaptacije na uslove spoljašnje sredine se pokazala kod beba u 1 minuti koje su ocenjene ocenama po Apgaru od 4 do 7 u ART grupi sa 12.7% na 5.7% u odnosu na spontane 8.1% na 4.8%. Istovremeno u intervalu od 5 minuta ocene po AP od 8-10 je u 1 minuti imalo 85.9% ART beba u odnosu na 90.%, prema 5 min 93.2% prema 94.3% što je bez značajne razlike ($p=0.643$).

Shodno našim rezultatima, Poikkeus i sar., 2007. navode značajne razlike u učestalosti dece ocenjene Ap 0-6 u 1 minuti 5.9% nakon SET, 6.1% nakon DET u odnosu na 3.7% u spontanoj populaciji ($p=0.05$).

Van Heesch i sar., 2014. kod IVF/ICSI jednoplodnih beba navode prosečan Apgar skor u 5 minuti 9.6 ± 0.8 sa 1.1% skorova manjih od 7, što je znatno bolje nego u našem slučaju sa nižim prosečnim 5 minutnim Apgar skorov i većim brojem njih sa ocenom manjom od 7.

Ako je beba nakon rođenja primana u NICU to je bilo češće ako je nakon ART 36/871 (4.1%) nego u spontanoj populaciji 23/877 (2.6%), ali bez statističke značajnosti. Prosečan boravak u jedinici intenzivne nege je duži nakon ART sa 7.65 ± 7.05 dana sa rasponom od 1 do 26 dana u odnosu na spontanu populaciju sa 4.61 ± 3.76 sa rasponom

od 1 do 15 dana, ali bez značajnosti rezultata.

Tomic, Tomic 2011. godine navode 25.1% prijema u NICU nakon ART u odnosu na 18.4% kod spontanijih jednoplodnih, sa prosečnom hospitalizacijom 7.8 ± 2.3 dana kod ART prema 4.3 ± 1.6 , ali u populaciji majki starijih od 35 godina ($p=0.125$). ART jednoplodne bebe ne zahtevaju veći prijem u NICU 9.6% u odnosu na spontane 9.8%, ali ni značajno duže ne borave prosečno u intenzivnoj nezi ako su primljene 14.4 dana u odnosu na 11.53 (Dhont i sar., 1997).

Suprotno našim nalazima, Pinborg i sar., 2010. navode ako je beba nakon ART sa svežim transferom biće verovatno češće lečena u NICU 13.5% u odnosu na FET bebu 11.6% i spontanu populaciju 8.4% ($p=0.001$), a prosečno će boraviti 13.7 ± 9 dana nakon svežeg ART u odnosu na 11.0 ± 6.0 dana u spontanoj populaciji, što nije značajno.

Intrauterina smrt ploda će se češće desiti u ART jednoplodnoj trudnoći 10/881 (1.1%) nego kod spontanijih trudnoća 4/881 (0.5%), ali nalaz nije statistički značajan $p=0.107$. Intrauterina smrt ploda FMU se poklapa sa mrtvorodenosti jer su svi slučajevi u trudnoći iznad 24 nedelje gestacije i preko 500 grama težine. Mrtvorodenost kod ART jednoplodnih na 45/4333 sa 1.0% u poređenju sa spontanom populacijom 1549/295220 sa 0.5% su slični našima (Davies i sar., 2012.).

Mrtvorodenost u spontanoj jednoplodnoj populaciji navodi Pinborg i sar., 2010. sa 0.4% u odnosu na sveži ART sa 0.6% i nakon FET sa 0.9%, što je znatno poredeći FET sa spontanom populacijom. Nalazi mrtvorodenosti u spontanoj populaciji jednoplodnih obuhvataju do 0.6%, a stope nakon Art se kreću do 1.0%, ali bez značajnosti.

Perinatalni mortalitet obuhvata mrtvorodenost gore definisani i rani neonatalni mortalitet do 42 dana života. Većina studija navodi preseke perinatalnog mortaliteta kao meru ishoda trudnoće odnosno neonatalnog statusa. Perinatalni mortalitet nakon ART je 16/881 sa 1.81%, a nakon spontanog začeća 12/881 1.36%, što je praktično bez razlike ($p=0.568$). Relativni rizik da kod bebe nakon ART dođe po perinatalne smrti je 1.33 (95% CI 0.64-2.80), $p=0.447$, što znači da nije značajno povišen. Pandey i sar. 2012., navode RR 1.97 za nastanak perinatalnog mortaliteta (95% CI od 0.90-3.35). Rezultate Verlainena i sar., 1995. sa 21.4% kod ART jedinaca u odnosu na 14.3% kod spontanijih jednoplodnih sa relativni rizikom za perinatalnu smrt 1.50 (95% CI 0.25-8.84), slično našim rezultatima i bez značajnosti.

Helmerhorst i sar., 2004 u metaanalizi studija imaju rezultat RR 1.68 (95% CI od 1.11-2.55) za mačovane kohortne studije, a za nemečovane 3.77 (95% CI 1.15-12.4), što govori o višem riziku za perinatalnu smrt. Suprotno našem istraživanju, dosta studija navodi znatno niže stope perinatalnog mortaliteta Koudstaal i sar., 2000. kod jednoplodnih ART 9.5‰ prema 3.3 ‰ uz RR 3.00 (95% CI 0.31-28.7), Isaksson i sar., 2002. godina sa 14.5 ‰ nakon ART i 14.5‰ u spontanim jednoplodnim sa RR 1.0 (95% CI 0.12-8.439), ali na znatno manjem broju ispitanika u uzorku.

Razlika unutar ART grupe zavisno od vrste metode koja je primenjena IVF ili ICSI se pojavila samo u nekoliko kategorija. Klasična metoda IVF je rađena u nešto većem procentu kod 455 žena (51.65) nego ICSI 426 (48.4%).

Naime, žene u ART grupi se ne razlikuju po prosečnoj starosti 35.88 ± 4.41 godina za IVF jednoplodne i 35.51 ± 4.13 za ICSI, ali je kod žena gde je rađen IVF veći procenat onih starijih od 40 godina (22.4%), a kod ICSI je više žena mlađih od 35 godina 39.0% ($p=0.03$). Što se tiče obrazovanja, u obe grupe dominiraju žene višeg ili visokog obrazovanja 44.2% i 47.7%, kao i u celom jednoplodnom ART uzorku. U akušerkoj anamezi dominiraju nulipare 94.3% prema 95.3%, sa podjednako zastupljenim spontanim pobačajima i ektopičnim graviditetom.

Očekivano je da je u indikacijama za postupak ART evidentna razlika naime u IVF grupi su tubarni, nepoznat i ovarijalni faktor najčešći, tj dominira ženski, kod ICSI je muški faktor, kombinovani i nepoznat.

Od komplikacija u trudnoći kod ICSI jednoplodnih trudnoća je povećana učestalost gestacijskog dijabetes melitusa u odnosu na IVF jednoplodne trudnoće (16.0% prema 8.8%, $p=0.03$), odnosno RR 1.8157 (95% CI 1.2573-2.6222), $p=0.0015$. Preklampsija koju dovode u vezu sa ovarijalnim faktorom infertiliteta, i stoga bi trebalo da bude više zastupljne na nakon IVF nije nađena u povećanom procentu (Woldringh i sar., 2006). Od ostalih obstetričkih komplikacija nema razlike u učestalosti hipertenzivnih poremaćaja u trudnoći, PPRM, antepartalne hemoragije (centralna placenta previja, abrupcija placente), potrebe za aplikovanjem serklaža, što figurira i u nalazima drugih autora Pinborg i sar., 2013).

Međutim, Nouri i sar., 2013; Stuebe i sar., 2006, navode veću učestalost PPRM, cervikalne insuficijencije i prevremenih uterinih kontrakcija kod IVF trudnoća, što se uklapa u povećanu učestalost pretermijskih porođaja, ali su u ovim istraživanjima

evidentno relativno manji uzorci iz tercijarnih centara.

Postoje indicije da ne samo faktori od strane roditelja već i efekti same laboratorisjke procedure mogu biti odgovorni za nepovoljne perinatalne efekte jednoplodnih ART trudnoća. Faktori laboratorije ne uključuju samo vrste kulture medijuma i boravak u njima, već i specifične procedure posebno ICSI, kao i vitifikaciju i kriopostupke sa embrionima, koje je vrlo teško odvojiti od uticaja kontrolisane ovarijalne stimulacije. Pinborg i sar., 2013 godine sa metaanalizom 65 studija sa jednoplodnim trudnoćama nakon ART u kategorijama pretermijski porođaj, LBW ispod 2500 grama, VLBW ispod 1500 grama, SGA i perinatalni mortalitet. Tri studije su prijavile značajno niži rizik od pretermijskog porođaja ili LBW nakon ICSI metode u odnosu na IVF, dok su ostale pokazale slične rezultate nakon ICSI u odnosu na IVF, a nijedan nalaz nije pokazao nepovoljne nalaze u odnosu na ICSI (Kallen i sar, 2002. godine su naveli AOR 0.96, 0.80-1.15 95% CI) rizik prevremenog porođaja ICSI prema IVF jednoplodnim trudnoćama, Ombet i sar., 2006., AOR 0.58 (0.47-0.81), Romundstadt i sar., 2008. AOR 0.85 (0.69-1.05), Pinborg i sar., 2010. AOR 0.75 (0.64-0.87), Nelson i sar., 2012. 0.89 (0.80-1.0). Ukupan rezultat je pokazao da ICSI jednoplodne trudnoće imaju niži rizik pretermijskog porođaja u odnosu na IVF jednoplodne trudnoće AOR 0.80 (95% CI 0.69-0.90, $p=0.002$). Većina navedenih studija je pokazala i niži rizik pojave LBW ispod 2500 grama u ICSI jednoplodnim trudnoćama, ali samo studija Ombet i sar., 2005. godine sa statističkom značajnošću.

Wang i sar., 2005. godine su naveli povišen rizik nepovoljnog perinatalnog ishoda kod dece čije su majke sa ženskim faktorom infertiliteta (uglavnom se leče IVF) u odnosu na roditelje sa muškim faktorom infertiliteta (uglavnom se primenjuje ICSI), ukazujući na ulogu ne-afektirane odnosno majke bez faktora infertiliteta za pozitivan perinatalni ishod. Ovo se uklapa sa rezultatima gde se pri primeni ICSI metode dobija povoljniji perinatalni ishod jednoplodnih trudnoća jer je tu većina ženskih partnera zdrava u odnosu na populaciju sa primenom IVF metode.

U našem uzorku trudnoća nakon ICSI jednoplodne traju 38.22 ± 1.83 nedelja, nešto duže u odnosu na IVF jednoplodne 38.07 ± 1.81 sa rasponom od 26 do 41 nedelje, ali bez značajne razlike. Pretermijski porođaj ispod 37 nedelje gestacije će se češće desiti u IVF grupi 11.3% u odnosu na ICSI grupu 8.4% sa relativnim rizikom IVF za pretermijski porođaj RR 1.83 (95%CI 0.884-1.9900), $p=0.172$). Pinborg i sar., 2010.

godine navode 9.7% pretermiskog porođaja ispod 37 ng kod IVF jednoplodnih u odnosu na 7.8% kod ICSI, a suprotno našim nalazima kod pretermiskog porođaja ispod 32 nedelje gestacije nakon IVF 3.4% i nakon ICSI 2.5%, bez značajne razlike.

Interesantno je da u kategoriji prevremenog porođaja ispod 32 nedelje gestacije imamo više ICSI jednoplodnih beba 2.3% u odnosu na 1.8% kod IVF, ali razlika nije značajna i verovatno je posledica slučajnosti.. U našem uzorku IVF jednoplodne trudnoće imaju viši rizik pretermiskog porođaja u manjoj gestacijskoj starosti od 37 nedelje gestacije u odnosu na ICSI, ali bez mogućnosti zaključivanja zbog nedovoljne statističke značajnosti. Što se tiče pretermiskog porođaja, način završavanja trudnoće ne utiče na nalaze jer su i IVF i ICSI trudnoće završavane carskim rezom u 82.6% IVF jednoplodnih i 84.0% ICSI, i to elektivnim u skoro podjednakoj srazmeri.

Devojčice su češće u obe ART populacije i to 52.7% nakon IVF i 51.45 nakon ICSI. SSR (sex ratio na rođenju) ili sekundarni odnos polova je proporcija dečaka na rođenju i varijabilna je u humanoj populaciji. 1989. Thatcher i sar., su objavili da je nakon IVF SSR znatno viši nego u opštoj populaciji 64.1% dečaka. Ghazzawi i sar., su 2000. objavili da nakon primene ICSI metode imamo znatno veću proporciju devojčica 61.7%, što je pripisivano dejstvu muškog faktora infertiliteta. Međutim, ustanovljeno je da ne samo metoda, već i stadijum embriotransfera utiče na odnos polova u ART sa potencijalnim povećanje SSR sa transferom IVF blastocisti i smanjenjem SSR (muškog pola) sa transferom ICSI embriona u deobi 2. ili 3 dana (Dean i sar., 2010).

Nema razlike u prosečnoj dužini neonatusa sa 50.14 ± 3.28 nakon IVF i 50.18 ± 3.25 nakon ICSI kod jednoplodnih trudnoća. Prosečno su ICSI plodovi teži oko 30 grama u odnosu na IVF 3215.58 ± 578.40 grama u odnosu na IVF 3182.26 ± 612.26 grama, što nije statistički značajno. Nouri i sar.2013., navode prosečnu težinu kod ICSI 2583.8 ± 925.7 grama i nešto teži IVF sa 2990.8 ± 728.4 grama, $p=0.278$, što su suprotno našim rezultatima. Pinborg i sar.,2010. navode prosečnu masu na rođenju nakon IVF 3353 ± 660 grama i oko 60 grama teži ICSI 3414 ± 623 , ali bez statističke značajnosti.

Kod ICSI jednoplodnih trudnoća je zabeleženo manje LBW tj sa masom ispod 2500 grama 8.4% u odnosu na IVF 11.0%, ali razlika nije značajna sa RR 0.7690 sa (95% CI 0.5116-1.1559), $p=0.2060$ nižim za ICSI metodu u odnosu na IVF. Ako posmatramo VLBW sa masom ispod 1500 grama nakon ICSI je to u 1.4% dece, u odnosu na 2.0% nakon IVF sa RR 0.71 (95%CI 0.25-1.97), $p=0.5132$. Primećujemo da je relativni rizik

rađanja deteta nakon IVF sa masom manjom od 2500 grama LBW i 1500 grama VLBW niži kod ICSI nastalih jednoplodnih trudnoća u odnosu na IVF.

Slične rezultate našim navode i Pinborg i sar., 2010. sa 7.8% LBW ispod 2500 grama nakon IVF u odnosu na 6.6% nakon ICSI kod jednoplodnih i 2.0% VLBW ispod 1500 grama nakon IVF i 1.3% nakon ICSI, ali razlike ne dostižu statističku značajnost. Ako je plod nastao nakon IVF metode ART ima veći rizik da bude SGA 4.4% nego nakon ICSI metode 3.3%, ali bez statističke značajnosti.

Prosečni Apgar skorovi u 1. minuti su viši nakon ICSI 8.31 ± 1.42 u odnosu na IVF 8.20 ± 1.68 , ali nisu značajni ($p=0.258$). Apgar u 5 minuti pokazuje bolju adaptaciju kod i IVF i ICSI neonatusa pri čemu ICSI grupa ima više vrednosti 8.62 ± 1.21 u odnosu na IVF 8.49 ± 1.51 , $p=0.161$). Nouri i sar., 2013. godine navode suprotne rezultate sa značajno nižim prosečnim Apgarima u 1. minuti kod ICSI 7.90 u odnosu na 8.55 kod IVF ($p=0.04$), koje se održavaju i nakon 10 minuta sa 9.35 kod ICSI i 9.81 kod IVF ($p=0.04$).

Ako, pogledamo razliku u ocenjivanju dece odnosno učestalost Apgar skora manjeg od 7 u 1. minuti, kod ICSI metode 12.7% ima skor Ap manji od 7, a kod IVF 15.1% što je više, ali bez značajnosti. Relativni rizik da beba bude ocenjena ocenom manjom od 7 je 0.8379 (95% CI 0.602-1.166), $p=0.296$ ako je nastala posle ICSI u odnosu na to ako je nastala nakon IVF.

Nakon 5 minuta ponovnim ocenjivanjem Apgar skora smanjuje se učestalost Apgara nižih od 7 u obe grupe, ali se nakon IVF imao 7.0%, a nakon ICSI 6.3%, što govori o boljoj adaptaciji obe grupe neonatusa, pri čemu se učestalost izjednačava, ali RR za Apgar skor niži od 7 u 5 minuti nakon ICSI je 0.85 (95% 0.525-1.387), $p=0.515$ niži, nego nakon IVF.

Prosečna učestalost prijemu u NICU je ista i za IVF bebe 4.02% i za ICSI bebe 4.2% sa prosečno dužim boravkom ICSI beba 8.72 ± 6.88 dana u odnosu na IVF 6.61 ± 7.24 , što nije statistički značajno ($p=0.238$). Prosečan boravak jednoplodne bebe nakon IVF u NICU je 14.6 ± 20.0 dana, a kraće nakon ICSI sa 11.6 ± 16 dana, suprotno našim rezultatima, ali sa učestalosti prijema 14.0% nakon IVF i 12.6% nakon ICSI.

Verovatnoća prijema u NICU je ista za bebe rođene nakon IVF i ICSI, i ako je beba nakon ICSI nešto će duže boraviti u intenzivnoj nezi, ali razlika nije značajnija.

Moramo imati na umu da je u IVF grupi veća učestalost preterminskog porođaja ispod 37ng, koja za sobom donosi veću učestalost niske porođajne mase, nižu prosečnu ocenu po Apgaru i veći udeo ocena po apgaru niži od 7, a samim tim i veću stopu prijema u NICU u odnosu na trudnoće nakon ICSI.

Mrtvorodenost tj intrauterina smrtnost je češća nakon IVF i to 7/455 (1.5%) u odnosu na ICSI sa 3/426 (0.7%), ali nalaz nije statistički značajan ($p=0.243$). Pinborg i sar., 2010. navode slične nalaze sa 0.5% mrtvorodenja nakon ICSI i 0.7% mrtvorodenja kod IVF.

Perinatalni mortalitet je takođe viši ako je beba začeta nakon IVF 24.17‰ nego kada je nakon ICSI 11.77‰, sa RR 2.06 za perinatalnu smrt nakon IVF (95% CI 0.7216-5.8794), $p=0.1769$ u odnosu na ICSI metodu, ali nije statistički značajno. IVF jednoplodni plodovi imaju veći rizik perinatalne smrti nakon IVF 0.9% u odnosu na ICSI plodove 0.7% (Pinborg i sar., 2010), odnosno RR 1.29 (95% CI 0.8017-2.6892), $p=0.2913$.

U odnosu na jednoplodne trudnoće žene sa gemelarnim trudnoćama nakon ART su mlađe sa prosekom 34.21 ± 4.08 godina u odnosu na spontane blizance sa 33.91 ± 3.91 , bez značajnosti ($p=0.212$). Najviše žena je starosti ispod 35 godina (50.4%), a samo 8.8% je iznad 40 godina, što je skoro dva puta manje nego kod jednoplodnih ART trudnoća. Više i visoko obrazovanje je skoro podjednako zastupljeno (45.2% i 42.3%). Najveći broj su nulipare 95.4% bez razlike u broju spontanih abortusa u odnosu na spontanu populaciju. Populacija žena sa blizanačkim ART trudnoćama u anamnezi ima značajno veću učestalost ektopičnog graviditeta i broja dosadašnjih trudnoća od spontane blizanačke populacije, slično ,kao i kod jednoplodnih ART trudnoća.

Perinatalni ishod blizanačkih trudnoća nakon primene ART se ne razlikuje mnogo od perinatalnog ishoda spontanih gemelarnih trudnoća. Naime, smatra se da primena ART dovodi praktično do prednosti među blizanačkim trudnoćama koje su već opterećene mnogo više nego jednoplodne rizikom preterminskog porođaja i prematuriteta, kao i manje telesne mase, nižih Apgar ocena i češće prijema u NICU. 85% ciklusa ART u in vitro fertilizacije rezultuje vraćenjam više od jednog embriona, pa je tako najviše blizanaca porekla više embriona (Helmerhorst i sar., 2004). Dihorionski blizanci imaju bolji perinatalni ishod od monohorionskih koji obuhvataju 5 do 7% ART trudnoća i čak 30% spontanih blizanačkih trudnoća. Ranija detekcija blizanačkih trudnoća i stroži antenatalni nadzor nakon ART je jo jedan od faktora koji bi mogao da objasni bolji

perinatalni ishod ART blizanaca od spontanih.

Helmerhorst i sar., 2004., navode rezultate meta-analize 17 maćovanih i 8 nemećovanih studija o perinatalnom ishodu blizanaćkih trudnoća nakon ART sa i to RR 0.95 (0.78-1.15) za porođaj manje od 32 nedelje gestacije, RR 1.07 za pretermijski porođaj ispod 37ng (95% CI 1.02-1.13), za VLBW ispod 1500 grama 0.89 (0.74-1.07), za LBW ispod 2500 grama Rr 1.03 (0.99-1.08), za SGA 1.27 (0.97-1.65), za porođaj carskim rezom RR 1.27 (1.11-1.32), za prijem u NICU 1.05 (95% CI 1.01-1.09) i perinatalni mortalitet RR 0.58(0.44-0.77).

Uzroci infertiliteta su sa istom učestalošću, kao i kod jednoplodnih ART trudnoća odnosno najčešći je tubarni faktor sa 24%, slede muški sa 22%, nepoznat sa 18%, kombinovani sa 14% i ovarijalni sa 13%.

Od obstetrićkih komplikacija u trudnoći kod gemelarnih Art trudnoća nalazimo veću učestalost gestacijskog dijabetesa sa 11.1% nakon Art prema 6.8% kod spontanih blizanaca (p=0.01). Adler-Levy i sar., 2007. su slično našim rezultatima naveli učestalost gestacijskog dijabetesa od 21.9% nakon ART prema 8.3% spontanih blizanaca (p=0.001), sa relativnim rizikom 3.11(2.24-4.32) i p=0.005). Suprotno rezultatima drugih studija (Mc Faul i sar., 1993, Koudstaal i sar., 2000; Nassar i sar., 2003) koji ne nalaze povećanu učestalost gestacijskog dijabetesa kod ART gemelarnih trudnoća. Objašnjenje pojave bi obuhvatilo veću učestalost ovarijalnog faktora odnosno PCOS sa insulinskom rezistancijom u uzorku infertiliteta, što kod nas nije slučaj. Praktično, možda razloge treba tražiti u hormonskom profilu koji prati proces kontrolisane ovarijalne stimulacije sa povećanim koncentracijama estrogena, progesterona i IGF, koji su verovatno doprinose poremećaju glukozne regulacije i razvoju insulinske rezistancije. Adler-Levy i sar., 2007. su poredeći uzorke nakon ART sa IVF i trudnoće nakon ovarijalne stimulacije kod blizanaca, našli i povećanu učestalost gestacijskog dijabetesa i nakon ovarijalne stimulacije bez IVF u odnosu na spontanu blizanaćku populaciju.

U kategorijama hipertenzivni poremećaji u trudnoći, antepartalna hemoragija (placenta previja i abrupcija placente), PPRM, nema razlike u odnosu na poreklo blizanaćke trudnoće u našem istraživanju. Drugi autori (Adler-Levy i sar., 2007) navode i povećanu učestalost gestacijske hipertenzije (21.5 kod ART gemela u odnosu na 8.3% spontanih gemala, p=0.001) sa RR 2.63 895%CI 1.90-3.64), kao i PPRM (10.9% kod ART

gemela prema 5.7% u spontanoj blizanačkoj populaciji, $p=0.001$, sa RR 1.99 (1.3-3.04), suprotno našim rezultatima.

Prosečna gestacijska starost trudnoće u vreme porođaja kod ART gemela je značajno niža 35.87 ± 2.62 nedelja u odnosu na spontane blizance sa 36.28 ± 2.51 ($p=0.008$). Dhont i sar., 1999. navode slične vrednosti trajanja gestacije sa 36.19 ± 5.4 nedelje kod ART blizanaca u odnosu na 36.33 ± 2.3 nedelje kod spontanih blizanaca, ali bez značajne razlike. Adler-Levy i sar., 2007. navode prosečno trajanje gestacije kod IVF gemela 34.62 ± 0.14 nedelja, prema nešto dužoj gestaciji kod spontanih 35.95 ± 3.08 ($p=0.001$), što je kraće od našeg uzorka.

Pretermijski porođaj manje od 37 nedelja se dešava kod 50.4% ART blizanaca, a samo kod 43.2% spontanih blizanaca ($p=0.05$), odnosno RR je 1.23 sa (95% CI 0.98-1.28), $p=0.07$ da će se porođaj desiti pre 37 nedelje ako je trudnoća nakon ART u odnosu na spontanu. Dhont i sar., 1997. slično našim rezultatima navode pretermijski porođaj ispod 37 nedelje kod 52.2% ART blizanaca i 42.2% spontanih blizanaca, što je značajno ($p=0.04$). Koudstall i sar., 2000. takođe navode 51.0% ART blizanačkih trudnoća završenih pre 37 nedelje gestacije u odnosu na 41.7% kod spontanih sa RR 1.23 (0.99-1.52). Više od polovine gemela nakon ART će završiti trudnoću pre 37 nedelje gestacije 51% po Van Heesch i sar., 2014.

Davies i sar., 2012. navode 45.6% porođaja kod ART blizanaca od 32-37ng u odnosu na 40.4% kod spontane populacije sa relativnim rizikom RR od 1.12 (95% CI 1.06-1.19), $p=0.0001$. Ako pogledamo nalaze naše, primećujemo da veći deo razlike u učestalosti pretermijskih trudnoća čine trudnoće od 32-37 nedelje gestacije sa 42% ART grupe i 37.0% spontanih blizanaca, sa RR 1.16, (95% CI 1.003-1.339, $p=0.04$). Dhont i sar, 1997. navode slične nalaze sa 45.21% pretermijskih porođaja od 32-37 ng kod ART blizanaca i 37.39% porođaja kod spontanih blizanaca, sa RR za pretermijski porođaj 1.20 (95% CI 0.97-1.50, $p=0.08$).

Najugroženija grupa sa trudnoćom završenom pre 32 nedelje gestacije se kod ART blizanaca javlja u 7.5% prema 6.2% kod spontanih, dok drugi autori navode veću učestalost porođaja pre 32 nedelje gestacije kod spontanih trudnoća (Kouivurova i sar., 2002. 10.7% kod spontanih i 1.9% ART sa RR 0.18 (0.04-0.80), Dhont i sar., 1997. sa 7.2% spontanih blizanaca prema 7.0% ART blizanaca sa RR 0.97s (0.79-1.19). Van Heersch i sar., 2014. sa 7.5% porođaja manje od 32 nedelje gestacije kod IVF/ICSI

blizanaca navode rezultate kao naše.

U obe grupe je povećan rizik završavanja trudnoće carskim rezom sa znatno većom kod ART blizanaca sa 85.4% prema 60.2% kod kontrola ($p=0.000$) sa RR za završavanje trudnoće carskim rezom 1.23 (95% CI 1.10-1.36, $p=0.0002$). U obe grupe predominantna način carskog reza je elektivan sa 60.1% u ART blizancima prema 55.2% spontanih. Ostale studije takođe navode povećanu učestalost završavanja gemelarnih trudnoća carskim rezovima, ali sa mnogo manjim procentom blizanačkih trudnoća (Adler-Levy i sar., 2007. sa 67.9% trudnoća nakon ART i 41.5% spontanih blizanaca, Davies i sar., 2012. 64.9% nakon ART i 50.3% kod spontanih blizanaca, van Heersc i sar., 2014. navodi oko 41.0% carskih rezova u ART grupi. Blizanačke trudnoće se u visokom procentu završavaju carskim rezovima, ali vidimo da procenat ukupnog broja ART trudnoća koje se ovako završavaju varira. Ovako visok procenta u našem uzorku se uklapa i u visok postotak jednoplodnih trudnoća nakon ART koje se završavaju carskim rezom 83.3%, pa se ovde praktično indikacija gemeli, ART i pretermijski porođaj uzimaju kao ultimativne. Naime, verovatno prevashodno odnos akušera prema samoj blizanačkoj trudnoći, još nakon ART kao visoko-rizičnoj je odgovoran za ovakvu učestalost završavanja trudnoće carskim rezom. Ako se ima na umu da naša Klinika inače ima procenta carskih rezova oko 40% porođaja, rezultati ART trudnoća se uklapaju u opšte tendencije.

Često faktori prezentacije blizanaca odnosno prvog blizanca, utiču na odluku o načinu završavanja trudnoće. Naime u 65.5% ART prvi bliznac je prednjačio glavicom, zatim 27.9% karlicom, a kod spontanih isti redosled učestalosti prezentacija 63.4% glavica i 28.0% karlica. Drugi gemel u ART je prednjačio glavicom u 50.7%, karlicom u 23.4% i poprečno u 16.6% sa istim redosledom kod spontanih blizanaca sa glavicom 49.8%, karlicom 22.0% i poprečno 15.5%. Znači, praktično da se isti redosled prezentacija prvog i drugog blizanca različito tretirao zavisno od porekla blizanačke trudnoće. Pored evidentne diskrepancije u učestalosti vaginalnog porođaja, operativni vaginalni porođaj forcepsom je veoma redak u obe grupe 0.6% ($p=0.478$). Drugi autori navode i češću upotrebu forcepsa kod ART blizanačkih porođaja van Heersch i sar., 2014. 9.6% Va.

U ART blizanačkim trudnoćama je češća pojava cervikalne insuficijencije i aplikovanje serklaža nego kod spontanih trudnoća ($p=0.007$), što se može objasniti i većim procentom vaginalnih intrauterinih intervencija, kao i češćim antenatalnim kontrolama,

koje i ranije počinju.

Odnos dečaka i devojčica se uklapa sekundarni odnos polova odnosno 50.3% dečaka u odnosu na 49.7% devojčica, obrnuto od odnosa kod jednoplodnih ART trudnoća gde je procenta bio u korist devojčica. Drugi autori navode takođe Davies i sar., 2012. navode 51.8% dečaka i 42.1% devojčica kod gemelarnih trudnoća, Dhont i sar., 1997. 51.3% dečaka prema 48.7% devojčica.

Prosečna telesna masa blizanaca iz ART 2356.92 ± 572.27 grama je niža oko 35 grama od spontanijih blizanaca sa 2391.99 ± 580.22 sa rasponom od 500 do 4050 grama ($p=0.150$). Slične prosečne težine blizanaca navode i Dhont i sar., 1997. sa 2360 ± 557 grama kod ART blizanaca i 2427 ± 498 grama kod spontanijih blizanaca ($p=0.19$). Van Heersch i sar., 2014. prosečnu masu kod IVF/ICSI blizanaca 2441 ± 587 grama. Davies i sar. 2007 su izvestili da su spontani blizanci značajno teži (167 grama) sa 2407 ± 620 grama u odnosu na ART blizance 2240 ± 661 grama ($p=0.001$).

Najveći broj blizanaca u obe grupe ima telesnu masu veću od 2500 grama (46.7% ART i 49.1% kontrola). U kategoriji od 1500-2499 grama se nalazi nešto više ART blizanaca sa 45.2% prema 42.9% spontanijih, a oko 8.0% u obe grupe je lakše od 1500 grama ($p=0.517$), što je ista distribucija telesni masa, nezavisno od načina nastanka trudnoće. S obzirom na značajno veću učestalost preterminskog porođaja ispod 37 nedelje gestacije odnosno od 32-36 nedelje gestacije uz izostanak razlike u telesnim masama ispod 2500 grama, ali i niže vrednosti Ap skorova u 1. i 5. minuti, ako i većoj učestalosti prijema u NICU, ali i isti perinatalni ishod blizanaca nakon ART ukupni, kao i onaj u spontanijoj populaciji, verovatno je posledica slučajnosti. Više od 50% dece je bilo lakše od 2500 grama kod ART 53.3% i 50.9% kod spontanijih blizanaca.

Dhont i sar., 1997. navode sličnu distribuciju telesnih masa blizanaca sa 44.7% ART težih od 2500 grama prema 45.2% spontanijih, zatim 49.1% kod Art od 1500-2500 grama prema 49.1% spontanijih i 6.1% kod ART prema 5.7% kontrola ispod 1500 grama, bez statističke značajnosti, sa isto više od 50 % (55.3% nakon ART i 54.8% spontanijih) lakših od 2500 grama. Takođe, po prosečnoj dužini ART blizanci sa 46.03 ± 3.95 se ne razlikuju od spontanijih blizanaca sa 46.15 ± 3.92 cm ($p=0.452$).

SGA odnosno intrauterins restrikcija rasta se značajno češće pojavljuje kod spontanijih blizanaca sa 7.1% prema 4.7% kod kontrola ($p=0.05$) sa RR pojave SGA kod ART blizanaca 0.66 (95% CI 0.4689-0.9256, $p=0.01$). Adler-Levy i sar., 2007 takođe navode

veću učestalost zastoja u rastu kod spontane populacije sa 21.5% u odnosu na ART blizance sa 16.7% ($p=0.009$) i OR 0.73 (0.58-0.93) da će ART blizanci imati zastoj u rastu.

Prosečna ocena u 1. minuti postnatalne adaptacije je značajno niža kod ART blizanaca sa prosečno 6.77 ± 2.09 nego spontanih 7.21 ± 2.16 ($p=0.000$), dok se u 5 minuti obe prosečne ocene popravljaju, ali zadržavaju niže vrednosti kod ART gemela sa 7.44 ± 1.85 prema 7.68 ± 1.92 ($p=0.003$). Ako pogledamo udeo Apgar skorova manjih od 7 kod 53.9% beba iz ART grupe je tako ocenjeno prema 41.9% spontanih blizanaca ($p=0.000$). Međutim, i pored evidentnog popravljavanja adaptacije neonatusa na uslove spoljašnje sredine, i dalje 34% beba iz ART grupe i 26.8% spontanih blizanaca ima ocene niže od 7 ($p=0.001$). Relativni rizik da beba iz ART ima ocenu po Apgaru manju od 7 u 1. minuti je 1.29 sa 95% CI (1.1792-1.4057, $p<0.0001$).

Klemetti i sar., 2002. navode znatno manji procenat dece sa Apgarom manjim od 6 u ART grupi 15.0% i kod kontrola 12.8%, ali je i granični interval niži od onog u našem uzorku. Isaksson i sar., 2002. godine navode 10.0% Apgara nižih od 7 u ART blizancima sa nepoznatim faktorom infertiliteta prema 11.0% u spontanoj populaciji i 9.0% u ART populaciji svih blizanaca. Znatno niža učestalost Apgar skorova ispod 7 se može objasniti relativno malim uzorcima dve navedene studije.

Adler-Levy i sar., 2007. su odvojeno izvestili za svakog pojedinačnog blizanca o Apg skorovima nižim od 7 i dobili kod 15% ART i gemela u odnosu na 9.4% prvog blizanca kontrola sa RR 1.7 (95% CI 1.18-2.46, $p=0.04$), a kod II blizanca 18.4% prema 16.2% sa RR 1.16 (95% CI 0.84-1.62, $p=0.37$), što govori o značajno višem riziku I blizanaca nakon ART da bude ocenjen Apgar skorom nižim od 7.

Van Heesch i sar., 2014. navodi kod IVF/ICSI blizanačkih trudnoća neobičajeno visok prosečan Apgar sa 9.3 ± 1.2 u 5 minuti, sa samo 2.9% dece sa Apgarom nižim od 7, što ne nalazimo u izveštajima drugih autora.

Značajno je veća verovatnoća da beba iz blizanačke trudnoće nakon ART (19.28% prema 15.49% spontanih) bude primljena u NICU, kao i da prosečno duže boravi 7.93 ± 8.29 dana prema 6.8 ± 7.89 , u rasponu od 1 do 60 dana. Relativni rizik da beba nakon ART bude primljena u Intenzivnu neonatalnu negu je 1.242 (95% CI 1.032-1.493), $p=0.02$, u odnosu na blizanca iz spontane trudnoće.

Dhont i sar., 1997. navode takođe veći broj blizanaca nakon ART koji su tretirani u NICU 46.9% prema 26.1% spontanih blizanaca sa prosečno 17.9 dana boravka prema 20.9 dana spontanih. Navedena populacija pokazuje veću frekvenciju prijema u NICU, kao i prosečno duži boravak blizanaca u obe populacije, nego u našem uzorku. Prosečno duži boravak dece u intenzivnoj nezi se može objasniti i koncepcijom ne samo intenzivne nege, već i poluintenzivnih kapaciteta, zavisno od organizacije neonatalnih službi i nivoa akušerske ustanove, a ne boljim stanjem blizanaca u našem uzorku.

Van Heersch i sar., 2014. godine nižu učestalost prijema u NICU kod IVF/ICSI blizanaca sa 12.2% ili nešto dužim prosečnim boravkom sa 11.3 ± 14.3 dana od blizanaca u našem uzorku. Isaksson i sar., 2002. godine navode 10.0% učestalost prijema u NICU kod ART blizanaca sa nepoznatim faktorom infertiliteta u odnosu na 8.7% kontrolne populacije svih ART blizanaca i 7.5% spontane populacije blizanaca. Klemetti i sar., 2002. navode dosta veću učestalost prijema u NICU sa 45.2% nakon ART prema 43.8% spontane blizanačke populacije, što je skoro izjednačeno, ali znatno viši prijem od naših rezultata. Ako su blizanci hospitalizovani u NICU, 47.3% njih je boravilo duže od 7 dana nakon ART, a ako su spontani blizanci 37.8%.

Mrtvorodenost u kategoriji intauterino mortaliteta je veća u spontanoj populaciji sa 26/1120 (2.3%) nego u ART populaciji blizanaca 17/1120 (1.5%), ali razlika nema statističku značajnost. Neonatalni mortalitet je takođe viši kod kontrola sa 24/1094 (2.19%) u odnosu na ART grupu blizanaca 19/1103 (1.72%), ali bez statističke značajnosti.

Suprotno našim rezultatima Davies i sar. 2012. godine, navode slične stope mrtvorodenosti kod ART blizanaca sa 2.4% prema 2.0% spontane populacije.

Perinatalni mortalitet je viši kod spontane populacije blizanaca sa 4.46% u odnosu na 3.21% ART blizanaca i to na račun povišenog intrauterinog mortaliteta i neonatalnog ranog mortaliteta. Relativni rizik perinatalnog mortaliteta nakon ART je 0.72 sa 95% CI (0.4729-1.0962), $p=0.1256$, bez statističke značajnosti.

Kongenitalne anomalije se takođe češće javljaju u spontanoj populaciji nego nakon ART i to 56/1120 (5.0%) nego kod ART blizanaca 38/1120 (3.4%), računavši i mrtvorodene, kao i major i minor kongenitalne anomalije ($p=0.07$).

Što se tiče perinatalnog mortaliteta kod blizanaca u ART mešovane kohortne studije

navode oprečne tendencije. Isaksson i sar., 2002. godine nemaju perinatalni mortalitet kod ART blizanaca, a kod spontanih blizanaca 30‰ sa RR 0.38 (0.02-6.56) za pojavu mortaliteta nakon ART. Dhont i sar., 1999. beleže više perinatalnog mortaliteta u spontanoj populaciji 33.0‰ prema 24.6‰ kod ART blizanaca, sa RR pojave perinatalne smrti nakon ART 0.74 (0.54-1.03). Koudstaal i sar., 2000. godine navode 15.6‰ nakon ART prema 5.2‰ u spontanoj populaciji sa RR 3.00 (0.31-28.6).

Perinatalni ishod blizanci iz ART u našem istraživanju imaju relativni rizik pojave pretermuskog porođaja pre 37 nedelje gestacije 1.23 (95%CI 0.98-1.28), $p=0.07$ u odnosu na spontane blizance, RR od porođaja u dobu od 32-37 ng 1.12 (95% Ci 1.063-1.399), $p=0.04$, pretermuskog porođaja pre 32ng 1.20 (0.78-1.85), $p=0.409$, za rađanje sa masom manjom od 2500 grama LBW 1.04 (0.96-1.33), $p=0.26$, za rađanje deteta sa masom manjom od 1500 grama LVLBW 1.01 (0.76-1.349), $p=0.08$, za SGA ART blizanci imaju RR 0.66 (0.4689-0.9256) $p=0.01$, za porođaj carskim rezom RR 1.23 (1.10-1.36), $p=0.0002$, za ocenjivanje Apgar skorom manjim od 7 1.28 (1.1792-1.4507), $p<0.0001$, prijem u NICU relativni rizik je 1.24 (1.032-1.493), $p=0.02$, i perinatalni mortalitet 0.72 (0.4729-1.0962), $p=0.1256$ u odnosu na spontanu blizanačku populaciju.

IVF/ICSI blizanci imaju drugačiji ishod u odnosu na spontano začete blizance. Naime, kraće je trajanje gestacije, niža je prosečna ocena po Apgaru, više ih je ocenjeno ocenom nižom od 7, imaju češći prijem u NICU i prosečno duže ostaju, ali je krajnji ishod povoljniji od spontane populacije jer imaju niži perinatalni mortalitet i nižu stopu kongenitalnih malformacija (Isaksson i sar., 2002; Koudstaal i sar., 2000.)

Ako posmatramo ART blizance i njihov perinatalni i opstetrički ishod zavisno da li su nastali IVF ili ICSI metodom, ne nalazimo značajne razlike u pojavi komplikacija i neželjenih efekata. Žene kojima je rađena ICSI metoda su prosečno značajno mlađe sa 33.82 ± 3.91 prema IVF 34.58 ± 4.20 godina, svega 5.8% je starije od 40 godina, što se uklapa i sa različitim faktorima infertiliteta zbog koga su metode rađene. U IVF blizanačkoj grupi žene imaju u anamnezi više dosadašnjih trudnoća, više spontanijh pobačaja, veću učestalost ektopičnog graviditeta i manje nulipariteta, što govori u prilog opterećenijoj anamnezi infertiliteta, odnosno neuspešnijom reprodukciji. Faktori infertiliteta kod IVF u slučaju blizanaca su tubarni, nepoznat i ovarijalni, a kod ICSI muški, kombinovani i tubarni., pa je zato kod ICSI preovlađuje mlađa ženska populacija.

Češća pojava hipertenzivnih poremećaja u trudnoći se dešava nakon primene ICSI metode ($p=0.03$) i to uključuje hipertenziju, preeklampsiju i eklampsiju sa RR za dobijanje gestacijske hipertenzije nakon IVF kod blizanaca 0.73 (95% CI 0.5350-0.9770), $p=0.03$ u odnosu na ICSI blizance.

Wooldringh i sar., 2006. su povezali pojavu preeklampsije sa smanjenom ovarijalnom rezervom, ali mi nismo našli u IVF gemelarnoj grupi povećanu učestalost preeklampsije i pored znatne zastupljenosti ovarijalnog faktora. Nouri i sar., 2013. shodno našim rezultatima, nisu registrovali povezanost sa IVF grupom. Moguće, da je s obzirom na mlađe žene, bez trudnoća u anamnezi, drugi faktori, možda nezavisno od infertiliteta, odnosno činjenica da je same blizanačka trudnoća dovela do ovakvog nalaza, odnosno da je posledica drugih faktora. Shevell i sar., 2006. su istakli 2.7 puta češću pojavu preeklampsije u IVF/ICSI trudnoćama, jednoplodnim, ali ova etiologija je kontraverzna tj da li je imunološka, posledica medicinskih ko-morbiditeta infertilnog para ili samog ICSI postupka.

Genbachev i sar., 2003. su naveli sličnu etiopatogenezu idiopatskog infertiliteta i preeklampsije. Sama procedura ICSI i laboratorijski uslovi mogu sami po sebi biti predisponirajući faktor za preeklampsiju, jer je kritičan moment u razvoju preeklampsije nedovoljan razvoj ranog trofoblasta. Takođe, moramo imati u vodu da su i primipare predisponirajući faktor.

Nema razlike u prosečnom trajanju gemelarnih trudnoća zavisno od metode koncepcije posle IVF 35.84 ± 2.55 nedelja prema ICSI 35.90 ± 2.70 , učestalosti pretermanskog porođaja pre 37 nedelje gestacije, PPRM, s tim što se više trudnoća nakon ICSI završilo u terminu 53.3% prema 46.25 IVF, ali razlika nije značajna ($p=0.1959$). Trudnoće su u podjednakom procentu završavane carskim rezom 82.9% IVF i 88.0% ICSI., sa najvećim udelom elektivnog carskog reza oko 60% u obe grupe.

Prvi gemel je najčešće prednjačio glavicom i to 67.6% kod IVF i 63.5% kod ICSI, a zatim karlicom 26.6% IVF i 29.2% ICSI. Najčešća prezentacija II gemela je takođe glavicom 55.2% IVF i 46.0% ICSI, zatim karlicom 21.7% IVF i 25.2% ICSI i poprečno 14.0% IVF i 19.3% ICSI.

Najčešća kombinacija u okviru para blizanaca je dva dečaka kod IVF sa 54.3%, a kod ICSI devojčica i dečak u 51.9% parova. Nakon IVF je 50.5% devojčica i 49.5% dečaka, a nakon ICSI 51.1% dečaka prema 48.9% devojčica. Thatcher i sar., 1989., su objavili da

je nakon IVF SSR znatno viši nego u opštoj populaciji 64.1% dečaka. Ghazzawi i sar., su 2000. objavili da nakon primene ICSI metode imamo znatno veću proporciju devojčica 61.7%, što je pripisivano dejstvu muškog faktora infertiliteta. Međutim, ustanovljeno je da ne samo metoda, već i stadijum embriotransfera utiče na odnos polova u ART sa potencijalnim povećanje SSR sa transferom IVF blastocisti i smanjenjem SSR (muškog pola) sa transferom ICSI embriona u deobi 2. ili 3 dana (Dean i sar., 2010).

Prosečna telesna masa na rođenju blizanaca se ne razlikuje zavisno od vrste metode za IVF 2361.27 ± 27 grama i 2352.40 ± 573.77 kod ICSI, takođe nema razlike u učestalosti LBW (ispod 2500 grama) i VLBW (ispod 1500 grama), kao ni prosečnoj dužini blizanaca. Apgar skorovi prosečni u 1. i 5. minuti su komparabilni sa 6.83 ± 2.05 kod IVF i 6.70 ± 2.14 kod ICSI, kao i bolji Apgar skorovi u 5 minuti. Nema razlike u frekvenciji prijema u NICU 19.60% IVF i 18.62% ICSI sa prosečno nešto dužim boravkom ICSI dece sa 8.77 ± 9.12 dana.

Mrtvorodenost je jednako zastupljena kod ART blizanaca, nezavisno od vrste metode sa 1.4% nakon IVF i 1.6% nakon ICSI ($p=0.739$). Perinatalni mortalitet je 2.98% nakon IVF i 3.83% nakon ICSI metode ($p=0.4377$), a neonatalni mortalit nakon IVF 1.60% i 1.82% kod ICSI ($p=0.687$). Primećujemo da su stope mortaliteta neznatno više kod ICSI metode kadaa su blizanci u pitanju, ali razlika nije značajna.

Kongenitalnih anomalija ima podjednako kod ART blizanaca bez obzira na metodu koncepcije sa 3.33% nakon IVF i 3.46% nakon ICSI ($p=0.891$), a hromozomopatija više nakon IVF i to 0.70% u odnosu na 0.18% kod ICSI ($p=0.396$), ali rezultat nije značajan.

Mnoge studije su ukazale da sama tehnika IVF nema uticaja nema ili ima vrlo malo uticaja na tok trudnoće ili neonatalni ishod (Kallen i sar., 2005; Romundstad i sar., 2008; Kallen i sar., 2010). Najveće promene u ovoj oblasti podrazumevaju povećanje upotrebe ICSI metode, ali to nije uticalo mnogo na promenu perinatalnog shoda nakon primene i IVF i ICSI metode. Povećana učestalost primene ICSI metode je prevashodno zbog povećanog broja indikacija muškog infertiliteta, mada su i druge indikacije postale češće. Primećeno da je su za IVF proceduru odnosno ženski infertilitet vezana češća pojava poremećaja placentacije odnosno centralna placenta previja, abrupcija placente i preeklampsija.

Schieve i sar., 2004. su naveli da je aktuelna incidencija placente previje u spontanog

populaciji 0.2% za jednoplodne i blizanačke trudnoće, 1.6% kod jednolodnih IVF i 0.8% kod ART blizanaca, što veoma niska učestalost inače. Smatra se da u nastanku placente previje ima ulogu i tehnika embriotransfera. Velika studija bazira na registrima je pokazala povišen rizik od nastanka placente previje i kod jednoplodnih (OR 5.6, 95% CI 4.4-7.0) i blizanačkih trudnoća nakon IVF (OR 2.9, 95% CI 1.5-5.8 - Romundstad i sar., 2006).

Ombelet i sar., 2005. su na 3974 IVF i 1655 ICSI jednoplodnih trudnoća i na 2901 IVF i 1102 ICSI blizanaca pokazali sličan obstetrički ishod. Jedini značajan ishod je veći rizik pojave prematuriteta nakon IVF tj preterminskog porođaja ispod 37 nedelje gestacije kod jednoplodnih trudnoća (12.4% IVF prema 9.2% ICSI, OR 1.39 sa 95% CI 1.15-1.70). Kod blizanačkih trudnoća je veća incidenca mrtvorođenosti u ICSI grupi (2.08% prema 1.03% IVF, OR 2.04, 95% CI 1.14-3.64). Takođe je i IUGR češće zabeležen u ICSI grupi.

Pitanje kongenitalnih malformacija nakon ART, posebno nakon primene ICSI metode je veoma kontraverzno. Ovo je tematika koja najviše interesuje i buduće roditelje deteta iz IVF/ICSI bilo da se radi o jednoplodnoj ili blizanačkoj trudnoći.

Počevši od 2000. godine sa sve raširenijom upotrebom ICSI metode, počinje i sve više studija da se bavi bezbednošću same IVF/ICSI metode, odnosno učestalošću nastanka kongenitalnih malformacija. Bonduelle i sar., 2002. su poredeći decu nakon dve metode našli rizik od 4.7% nakon IVF (135/2895) i 4.2% nakon ICSI(122/2889), ali bez značajnih razlika.

Velika studija iz zapadne Australije (Hansen i sar., 2012) na osnovu populaciona registra je navela major kongenitalne malformacije dijagnostikovane kod 8.7% jednoplodne dece nakon ART u odnosu na 5.4% spontane populacije (OR 1.53, 95% CI 1.30-1.79), kao i 7.1% ART blizanaca u odnosu na 5.9% blizanaca iz spontane populacije (OR 1.08, 95% CI 0.77-1.51). ART jednoplodne trudnoće imaju znatno viši rizik da imaju multiple anomalije (OR 1.97, 95% CI 1.38-2.80), kao i anomalije kardivaskularnog, muskuloskeletnog, gastrointestinalnog i genitalnog sistema sa spontanim jednoplodnim trudnoćama. Dečaci rođeni iz jednoplodnih ART trudnoća imaju povišen rizik za hipospadiju i kriptorhizam, čak i ako ih ograničimo na rođene u terminu, OR hipospadije 2.61 (95% CI 1.52-4.48) i OR kriptorhizam 1.74 (95% CI 1.05-2.87). ICSI jednopodne trudnoće imaju više od 2.0 veći rizik da imaju hromozomopatiju (OR 2.52,

95% CI 1.26-4.26) i kardiovaskularne defekte (OR 2.04, 95% CI 2.04, 95% CI 1.09-3.83), ali ako isključimo KVS defekte u vezi sa hromozomopatijama, učestalost njih se izjednačava za IVF i ICSI. KOD IVF/ICSI blizanaca ART donosi 2.3 puta veću verovatnoću da se dijagnostikuje major kongenitalna malformacija u odnosu na spontano začete bez obzira na pol (95% CI 1.09-5.11). ART bizanci imaju povišen OR za kardiovaskularne, muskuloskeletne iiii urinarne defekte, iako je grupa urinarnih defekata jedina gde značajno povišen rizik (OR 3.00, 95% CI 1.14-7.90). Dečaci blizanci nakon ART imaju povišen rizik za kriptorhozam (OR 2.32, 95% CI 0.88-6.11), ali ne i hipospadije.

Retrospektivna analiza grupe iz zapadne Australije na osnovu tri populaciona registra je izvestila o značajno povišenom riziku pojave major malformacija dijagnostikovanih kod dece uzrasta do 1. godine nakon IVF (RR 2.0, 95% CI 1.5-2.9) kao i nakon ICSI (RR 2.0, 95% CI 1.3-3.2) na 301 detetu nakon ICSI, 837 nakon IVF i 4000 spontane populacije (Hansen i sar., 2002).

Prospektivna kontrolisana studija (Katalinic i sar., 2004) je potvrdila povišen rizik kongenitalnih malformacija za trudnoće nastale nakon ICSI (8.7%, 295/3372) u poređenju sa spontanom koncepcijama (6.1%, 488/8016), sa RR 1.44 (95% CI 1.25-1.65). Ako su nalazi korigovani u odnosu na godine majke, malformacije roditelja i nalaze prethodnih trudnoća sa mrtvorodenjem ili deteta sa maformacijamaa, rizik je i dalje ostao povišen. Visok procenat kongenitalnih malformacija u ovoj studiji se objašnjava time da su uključena sva deca iz spontanih i indukovanih pobačaja, mrtvorodena. Rizik nije povezan ni sa razlikama u procentu multiplih trudnoća, indikacija za ICSI, nalaza spermogram, kao ni načina dobijanja spermatozoida.

I studije (Ericson, Kallen, 2001, Wennerholm i sar., 2000) takođe su prijavile viši rizik za major kongenitalne malformacije nakon IVF/ICSI koncepcija, i odustvo razlike među ART decom vezano da li je koncepcija ostvarena IVF ili ICSI metodom. Pinborg i sar., 2013. su meta-analizom zaključili da povišen rizik za kongenitalne malformacije nakon ICSI dece u odnosu na IVF decu ili spontano začetu. Hindryckx i sar., 2010. su naveli učestalost major malformacija nakon ICSI čak 6.5%. Uprkos mnogim izveštajima koji navode povišen rizik nakon ART za kongenitalne malformacije, većina autora ne uvažava rezultate jer mnogi nalazi povišenog rizika nisu bili statistički značajni (Zadori i sar., 2003, Sutcliffe i sar., 2001).

U našem istraživanju rizik kongenitalnih malformacija dece nakon IVF/ICSI je 0.8438 (95% CI 0.5905-1.2055, $p=0.3507$) odnosno snižen u odnosu na opštu populaciju. S obzirom na visoku učestalost kongenitalnih malformacija u spontanoj populaciji jednoplodnih i višeplođnih trudnoća, smatramo da su posledica gomilanja zbog nivoa tercijarne ustanove, gde se takvi slučajevi upućuju iz cele države, a uzeti su metodom slučajnog izbora majke za kontrole jer su odgovarale IVF/ICSI populacijom. Naime, skupina spontanih blizanačkih trudnoća je odgovorna za navedenu razliku u učestalosti kongenitalnih anomalija u spontanoj populaciji, dok kod jednoplođnih trudnoća ih ima više u ART populaciji, ali ne značajno.

Što se tiče abnormalnih kariotipa u istraživanju, oni su retki, ali ih je duplo više nakon ART. Rizik da će trudnoća nakon ART biti komplikovana patološkim kariotipom je 2.0 (95% CI 0.6032-6.6313, $p=0.2570$) u odnosu na plod iz spontane gestacije, ali bez statističke značajnosti. Unutar ART populacije 5 slučajeva je nakon IVF i 2 slučaja nakon ICSI metode tj relativni rizik hromozomopatija nakon IVF metode je 1.58 (95% CI 0.3799-6.6158, $p=0.5237$) u odnosu na primenu ICSI metode. Od hromozomopatije nakon ART najčešći de je Sy Down (50% slučajeva), zatim 2 slučaja 47xxy i 1 slučaj inverzije hromozoma 9 sa p12q13 i 1 slučaju duplikacije 15 p u ART grupi.

Woldringh i sar., 2010. su revijom sa 389 studija posmatrali abnormalne kariotipe i kongenitalne malformacije nakon primene ICSI metode sa ne-ejakuliranom spermom i zaključili da nema razlike u učestalosti abnormalnih kariotipa bez obzira na metodu dobijanja sperme.

Mora se uzeti u obzir i da rizik aneuploidija zavisi i od godina majke (više od 35), Bonduelle i sar., 2002. su naveli 2.2% de novo anomalija u grupi kod majki više od 34 godine u ART, a 1.2% kod fetusa tamo gde su majke mlađe od 34 godine. Takođe, problem sa analizom kariotipa u ART trudnoćama je da mnoge žene oklevaju sa invazivnom dijagnostikom zbog dugog čerkanja na potomstvo i rizika koji postoji vezan za procedure, pa se mnogi poremećaji kariotipa otkriju postnatalno i ne registruju ažurno.

Aboulghar i sar., 2001. su naveli povećanu incidencu hromozomopatija nakon ICSI i to podjednako raspoređenih između autozomalnih i polnih hromozoma. Bonduell i sar., 2002. su naveli da je nešto manje IVF trudnoća rezultovalo živorođenjem u odnosu na ICSI trudnoće (69.5% prema 73.3%, $p<0.001$, ukazujući da nema povećane eliminacije

genetskih anomalija vezanih za ICSI u ranoj trudnoći. Nešto više de-novo hromozomskih anomalija je primećeno kod ICSI dece (1.6%) u odnosu na spontanu populaciju (03.-04.%) prilikom prenatalnog testiranja i to je izgleda u vezi sa koncentracijom spermatozoida manjom od 20 miliona/ml ili abnormalnom pokretljivošću. Takođe, da su hromozomopatije polnih hromozoma odgovorne za najveći deo de novo aberacija.

Neki autori su naveli da rizik hromozomski aberante sperme se povećava sa upotrebom ne-ejakularane za ICSI. (Aboulghra i sar., 2005). Poređenjem 195 dece nakon TESE u poređenju sa ICSI ejakulatom nije nađeno povećanje de-novo hromozomskih anomalija (Belva i sar., 2011).

ZAKLJUČCI

U vezi sa postavljenim ciljevima iznosimo zaključke istim redosledom.

I. Trudnoće jednoplodne nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih po toku i ishodu. U okviru ovog zaključka posmatrali smo:

1. Jednoplodne trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih po većoj učestalosti gestacijskog dijabetesa i hipertenzivnih poremećaja u trudnoći.
2. Jednoplodne trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije imaju kraće trajanje gestacije od spontano začetih trudnoća.
3. Jednoplodne trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se češće završavaju carskim rezom za razliku od spontano začetih jednoplodnih trudnoća
4. Jednoplodne trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih po neonatalnom ishodu trudnoće u telesnoj masi i oceni postnatalne adaptacije po Apgar skor
5. Jednoplodne trudnoće nakon asistirane reprodukcije se ne razlikuju u učestalosti kongenitalnih malformacija i hromozomopatija u odnosu na spontano nastale.

II. Blizanačke trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije (IVF, ICSI) se ne razlikuju od spontano začetih po toku i ishodu. U okviru ovog zaključka smo utvrdili:

1. Blizanačke trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih po učestalosti gestacijskog dijabetesa u trudnoći
2. Blizanačke trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije imaju kraći gestacijski period od od spontano začetih blizanačkih trudnoća
3. Blizanačke trudnoće nastale metodama asistirane reprodukcije se ne razlikuju od spontano začetih po načinu završavanja trudnoće
4. Trudnoće blizanačke nastale metodama asistirane reprodukcije se razlikuju od spontano začetih po neonatalnom ishodu trudnoće u telesnoj masi i učestalosti prijema u neonatalnu intenzivnu negu

5. Nema razlike u učestalosti kongenitalnih malformacija i hromozomopatija u blizanačkim trudnoćama nakon asistiranje reprodukcije i spontano nastalih.

III. Jednoplodne nastale različitim metodama asistiranje reprodukcije (IVF, ICSI) se ne razlikuju međusobno po toku i ishodu trudnoće u zavisnosti od vrste metode. U okviru ovog zaključka smo utvrdili:

1. Jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistiranje reprodukcije se razlikuju međusobno u većoj učestalosti gestacijskog dijabetesa nakon ICSI metode
2. Jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistiranje reprodukcije se ne razlikuju međusobno u trajanju trudnoće zavisno od vrste metode
3. Jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistiranje reprodukcije se ne razlikuju međusobno u načini završavanja trudnoće zavisno od vrste metode
4. Jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistiranje reprodukcije se ne razlikuju međusobno po neonatalnom ishodu trudnoće zavisno od vrste metode
5. Jednoplodne trudnoće nastale različitim metodama asistiranje reprodukcije se ne razlikuju međusobno u učestalosti pojave kongenitalnih malformacija i hromozomopatija zavisno od vrste metode

IV. Blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistiranje reprodukcije (IVF, ICSI) se ne razlikuju međusobno po toku i ishodu trudnoće zavisno od vrste metode. U okviru ovog zaključka smo utvrdili:

1. blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistiranje reprodukcije se razlikuju po većoj u učestalosti gestacijske hipertenzije nakon IVF metode
2. Blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistiranje reprodukcije se ne razlikuju međusobno u trajanju trudnoće zavisno od vrste metode
3. Blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistiranje reprodukcije se ne razlikuju međusobno u načini završavanja trudnoće zavisno od vrste metode
4. Blizanačke trudnoće nastale različitim metodama asistiranje reprodukcije se ne razlikuju međusobno po neonatalnom ishodu trudnoće zavisno od vrste metode

5. Trudnoće blizanačke nastale različitim metodama asistirane reprodukcije se ne razlikuju međusobno u učestalosti pojave kongenitalnih malformacija i hromozomopatija zavisno od vrste metode.

LITERATURA

1. Aboulghar H, Aboulghar M, Mansour R, Serour G, Amin Y, Al-Inany H. A prospective controlled study of karyotyping for 430 consecutive babies conceived after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001; 76:249-253.
2. Aboulghar M. Perinatal complications of assisted reproduction. *Croat Med J* 2005;46:751-756.
3. Adler-Levy Y, Lunenfeld E, Levy A. obstetric outcome of twin pregnancies conceived by in vitro fertilization and ovulation induction compared with those conceived spontaneously. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007;133:173-78.
4. Akman MA, Erden HF, Tosun SB, Bayazit N, Aksoy E, Bahcecci M. Addition of GnRH antagonist in cycles of poor responders undergoing IVF. *Hum Reprod* 2000;15:2145.
5. Alam V, Bernardini L, Gonzales J, et al. A prospective study of echogenic endometrial characteristics and pregnancy rates during hormonal replacement cycles. *J Assist Reprod Gemet* 1993;10:215-218.
6. Albano CJ, Camus M, Riethmuller-Winzen H, Siebert-Weigel M, Diedrich K, Van Steirteghem AC, Devroey P. Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1997;67:917.
7. Allegrucci C, Thurstob A, Lucas E, Young L. Epigenetics and germline. *Reproduction* 2005;129(2):137-149.
8. Allen VM, Wilson RD, Cheung A. pregnancy outcomes after assisted reproductive technology. *J Obstet Gynecol Can* 2006;28:220-250.
9. Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garissi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod* 2000;15:2634.
10. Alikani M, Cekleniak NA, Walters E, Cohen J. Monozygotic twinning following assisted conception: an analysis of 81 consecutive cases. *Hum Reprod* 2003;18:1937-43.
11. Almog B, Rimon E, Yovel I, Bar-Am A, Amit A, Azem F. Vertebral osteomyelitis: a rare complication of transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval. *Fertil Steril* 2000;73:1250-2.
12. Al-Shawaf T, Yang D, Al-Magid Y, et al. Ultrasonic monitoring during replacement of frozen/thawed embryos in natural and hormone replacement cycles. *Hum Reprod* 1993;8:2068-2074.
13. Apantaku O, Chandrasekaran I, Bentick B. Obstetric outcome of singleton pregnancies achieved with in vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection: Experience from a district general hospital. *J Obstet Gynecol* 2008;23:398-402.
14. American Society for Reproductive Medicine. Guidelines on number of embryos transferred, Birmingham, Alabama, 2004.
15. Australian in Vitro fertilization Collaborative Group. High incidence of preterm births and early losses in pregnancy after in vitro fertilization. *BMJ* 1985;291:1160-3.

16. Bartoov B, Berkowitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, barak Y. Real-time fine morphology of motile humansperm cells is associated with IVF/ICSI outcome. *J Androl* 2002;23:1-8.
17. Baart EB, van der Berg I, Martini E, Fussen HJ, Fauser BCJM, van Opstal D. FISH analysis of 15 chromosomes in human day 4 5 preimplantation embryos: the added value of extended aneuploidy detection. *Prenatal Diagnosis* 2007;27:55-63.
18. Basille C, Frydman R, El Aly A, Hesters L, Fanchin R, Tachdjian G, Steffan J, LeLorc M, Archour-Frydman N. Preimplantation genetic diagnosis: State of ART. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;145:9-13.
19. Bassil S. Changes in endometrial thickness, width, length and pattern in predicting pregnancy outcome during ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;18:258-63.
20. Belva F, De Schrijver F, Tournaye H, Liebers I, Devroey P, Haentjens P, Bonduelle M. neonatal outcome of 724 children born after ICSI using non-ejaculated sperm. *Hum Reprod* 2008;26:1752-1758.
21. Bentov Y, Levitas E, Silberstein T, Potaschik G. Cullens sign following ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval. *Fertil Steril* 2006;85:227.
22. Ben-Schlomo I, Schiff E, Levran D, Ben-Rafael Z, Maschiasch S, Dor J. Failure of oocyte retrieval during in vitro fertilization: a sporadic event rather than a syndrome. *Fertil Steril* 1991;55:324.
23. Belva F, De Schrijver F, Tournaye H, Liebaers I, Devroey P, Haentjens P, Bonduelle M. Neonatal outcome of 724 children born after ICSI using non-ejaculated sperm. *Hum Reprod* 2011;26:1752-1758.
24. Bergh C, Howles CM, Borg K, Hamberger L, Josefsson B, Nilsson L, Wikland M. Recombinant human follicle stimulating hormone (r-hFSH; Gonal F) versus highly purified urinary FSH (Metrodin HP): results of a randomized comparative study in women undergoing assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 1997;12:2133-2139.
25. Berkowitz A, Estes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, et al. How to improve IVF/ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online* 2006;12:634-8.
26. Berkowitz A, Estes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg B, Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 2006;21:1787-90.
27. Bhasin S, Singh AB, MAC RP, Carter B, Lee MI, Cunningham GR. Managing the risks of prostate disease during testosterone replacement therapy in older men: recommendations for a standardized monitoring plan. *J Androl* 2003;24:299.
28. Bielanska M, Tan SL, Ao A. High rate of mixoploidy among human blastocysts cultured in vitro. *Fertil Steril* 2002;78:1248-1253.
29. Blake D, Proctor M, Johnson N, Olive D. Cleavage state versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conceptions. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; CD002118.
30. Blickstein J. Estimation of iatrogenic monozygotic twinning rate following assisted reproduction: pitfalls and caveats. *Am J Obstet and Gynecol* 2005;192:365-8.
31. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility

medical care. *Hum Reprod* 2007; 22:1506-12.

32. Borini A, Coticchio G. The human oocyte: controlled rate cooling. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Sholam Z, eds. *Textbook of Assisted reproductive Technologies-laboratory and clionnical perspectives*. Informa Heatlcare 2009; 255-266.

33. Branigan EF, Estes MA. Minimal stimulation IVF using clomiphene citrate and oral contraceptive pill pretreatment for LH suppression. *Fertil Steril* 2000;73:587.

34. Brison DR, Roberts SA, Kimber SJ. How should we assess the safety of IVF technologies? *Reprod Biomed Online* 2013;27:710-721.

35. Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, et al. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod* 2002;17:671-694.

36. Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirghem A, Liebaers I. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 2002;17:2600-2614.

37. Bonduelle M, Camus M, De Vos A, et al. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod* 1997;14(suppl 1):18-20.

38. Bonduelle M, Camus M, De Vos A, Staessen C, Tornaye H, Van Assche E, et al. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod* 1999;14 (Suppl 1): 234-64.

39. Bowdin S, Allen C, Kirby G, Brueton L, Afnan M, Barratt C, Kirkman-Brown J, Harrison R, Maher ER, Reardon W. A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum Reprod* 2007;22:3237-3240.

40. Buckett WM. A review and meta-analysis of prospective trials comparing different catheters used for embryo transfer. *Fertil Steril* 2006;85(3):728-34.

41. Chan PT, Palermo GD, Veeck LL, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Testicular sperm extraction combined with intracytoplasmic sperm injection in the treatment of men with persistent azoospermia postchemotherapy. *Cancer* 2001;92:1632.

42. Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman C. Modeling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Bio Med Online* 2013;26:477-485.

43. Capalbo A, Renzi L, Cimadomo D, Maggiuli R, Elliot T, Wright G, Nagy ZP, Ubaldi FM. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involved 956 screened blastocysts. *Hum Repro* 2014;0:1-9.

44. Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM, Jellad S, Vanderzwalmen P, Balet R, et al. A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. *Fertil Steril* 2009;92:1616-25.

45. Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine. 2001 assisted reproductive technology success rates, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, Georgia, 2003.

46. Cedrin-Durnerin I, Bulwa S, Herve F, Martin-Pont B, Uzan M, Hugues JN. The hormonal flare-up following gonadotropin-releasing hormone agonist administration is influenced by a progestogen pretreatment. *Hum Reprod* 1996;11:1859.

47. Chang P, Kenley S, Burns T, Denton G, Currie K, De Vane G, O Dea L.

Recombinant human chorionic gonadotropin (hCG) in assisted reproductive technology: results of a clinical trial comparing two doses of rhCG(Ovitrel) to urinary hCG(Profasi) for induction of final follicle maturation in in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2001;75:1111.

48. Chason RJ, Csokmay J, Segars JH, DeCherney AH, Armant DR. Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22:412-420.

49. Chappel S, Keltor C, Nugent N. Expression of human gonadotropins by recombinant DNA methods. In Genazzani AR, Feraaglia F (eds), *Proceedings of 3rd World Congress on Gynecological Endocrinology*, Parthenon Publishing Group, Canrforth, UK, pp 179-184, 1992.

50. Ckeck JH, Nowroozi K, Choe J, Lurie D, Dietterich C. The effects of endometrial thickness and echo pattern on in vitro fertilization outcome in donor oocyte embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 1993;59:72.

51. Check JH, Dietterich C, Lurie D. Non-homogenous hyperechogenic pattern 3 days after embryo transfer is associated with lower pregnancy rates. *Hum Reprod* 2000;15(5):1069-1074.

52. Chen Su, Lien YR, Chal KH, Ho NH, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implication in oocyte freezing-a review article. *Mol Cell Endocrinol* 2003;202:101-7.

53. Chen CD, Chao KH, Yang JH, Chen SU, Ho NH, Yang YS. Comparison of coasting and intravenous albumin in the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2003;80:86.

54. Chian RC, Huang JY, Gilbert L, Son WY, Holzer H, Cui SJ et al. Obstetric outcomes following vitrification of in vitro and in vivo matured oocytes. *Fertil Steril* 2009;91:2391-8.

55. Cho MM, McGovern PG, Colon JM. Vaginal perforation during transvaginal ultrasound-guided aspiration in a woman undergoing multiple cycles of assisted reproduction. *Fertil Steril* 2004;81:1695-6.

56. Clayton-Smith J, Laan L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet* 2003;40:87-95.

57. Cohen J, Simons RF, Edwards RG, et al. Pregnancies following after the frozen storage of expanding blastocysts. *J In Vitro Fert Embryo Trans* 1985;2:59-64.

58. Cohen J, Avery S, Campbell S. Follicular aspiration using a syringe suction system may damage zona pellucida. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1986;2:224-226.

59. Cohen J, Grudzinkas D, Johnson M. Embryonic DNA sampling without biopsy: the beginnings of non-invasive PGD? *Reproductive Bio Medicine Online* 2013;26:520-521.

60. Cohen J, Scott R, Alikani M, et al. Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol Human Reprod* 1998;4:269-280.

61. Collins JA, Burrows EA, Yeo J, Younglai EV. Frequency and predictive value of antisperm antibodies among infertile couples. *Hum Reprod* 1993;8:592.

62. Cooperman AB. Antagonists in poor-responder patients. *Fertil Steril* 2003; 80 (Suppl 1) S 16.

63. Coroleu B, Mourelle FL, Hereter L, et al. Ureteral lesion secondary to vaginal ultrasound follicular puncture for oocyte recovery in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997;12:948-950.
64. Coroleu B, Barri PN, Carreras O, Martinez F, Parriego M, et al. The influence of the depth of embryo replacement into the uterine cavity on implantation rates after IVF: a controlled ultrasound-guided study. *Hum Reprod* 2002;17:341-346.
65. Coulam CB, Stern JJ, Stouksen DM, Britten S, Bustillo M. Comparison of pulsatility indexes on the day of the oocyte retrieval and embryo transfer. *Hum Reprod* 1994;10:82-84.
66. Cox GF, Burger J, Lip V, et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002;71:162:164.
67. Crosignani PC, Collins J, Cooke ID, Diczfalusy E, Rubin R. Recommendations of the ESHRE workshop on "Unexplained infertility". Anacapri, August 28-29. 1992. *Hum Reprod* 1993;8:977.
68. Davies M.J, Moore V.M, Wilson K.J, Van Essen P, Priest K, Scott H, Haan E.A, Chan A. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N Eng J Med* 2012; 366:1803-1813.
69. D'Alessandro, Federica G, Palini S, Bulletti C, Zolla I. A mass spectrometry-based targeted metabolomics strategy of human blastocoele fluid: a promising tool in infertility research. *Molecular BioSystems* 2012;8:953-958.
70. Daya S. Gonadotropin releasing hormone agonists protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; CD001299.
71. Dean JH, Chapman MG, Sullivan EA. The effects on human sex ratio at birth by assisted reproductive technology (ART) procedures-an assessment of babies born following single embryo transfers, Australia and New Zealand, 2002-2006. *BJOG* 2010;117:1628-1634.
72. Delgadillo JCB, Mendez LMA, Chavez VG, Acosta SV, Solis VS, Gavino FG. Perinatal results in pregnancies obtained with embryo transfer in vitro fertilization: a case-control study. *Ginecol Obstet Mex* 2006;74:626-639.
73. de Jong D, Macklon NS, Eijkemans MJ, Mannarts BM, Coelingh Bennick HJ, Fauser BC. Dynamics of the development of multiple follicles during ovarian stimulation for in vitro fertilization using recombinant follicle-stimulating hormone (Puregon) and various doses of the gonadotropin-releasing hormone antagonist (Orgalutran/Antagon). *Fertil Steril* 2001;75:688.
74. de Vos A, van der Velde H, Bocken G, et al. Does intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improve embryo development? A randomized sibling oocyte study. *Hum Reprod* 2003;28:617-626.
75. de Vos A, van der Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2003;79:42-8.
76. Dellenbach P, Nisand I, Moreau L, Feger B, Plumere C, Gerlinger P, Brun B, Rumpler Y. Transvaginal, sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval. *Lancet* 1984;30:1391-1467.
77. Demirel A, Guven S, Gurgan T. Aphasia: an early uncommon complication of

ovarian stimulation without ovarian hyperstimulation syndrome. *Reprod Biomed Online* 2007;14:28-31.

78. Dessole S, Rubathu G, Ambrosini G, Miele M, Nardelli GB, Cherchi OL. Blood loss following noncomplicated transvaginal oocyte retrieval for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002;76:205-206.

79. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber S.J, Van Steirghem A.C. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994; 62:639-641.

80. De Neuborg D, Gerris J, Mangelschots K, Van Royen E, Vercruyssen M, Steylemans A, Elseviers M. The obstetrical and neonatal outcome of babies born after single-embryo transfer in IVF/ICSI compares favourably to spontaneous conceived babies. *Hum Reprod* 2006;21:1041-1046.

81. De Sutter P. Single embryo transfer (SET) not only leads to a reduction in twinning rates after IVF/ICSI, but also improves obstetrical and perinatal outcome of singletons. *Verh K Acad Geneeshd Belg* 2006;68:319-27.

82. Dickinson JE. Monoamniotic twin pregnancy: a review of contemporary practice. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2005;45:474-8.

83. Dickey RP, Olar TT, Curole DN, Taylor SN, Rye RH. Endometrial pattern and thickness associated with pregnancy outcome after assisted reproduction technologies. *Hum Reprod* 1992;7:418.

84. Diedrich K. Ovarian stimulation for assisted reproduction with HMG and concomitant midcycle administration of the GnRH antagonist cetrorelix according to the multiple dose protocol: a prospective uncontrolled phase III study. *Hum Reprod* 2000;15:1015.

85. Diedrich K, Diedrich C, Santos E, Zolli C, al-Hasani S, Reissmann T, Krebs D, Klingmuller D. Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1994;9:788.

86. Dhont M, de Neuborg FD, Van Der Elst J, De Sutter P. perinatal outcome of pregnancies after Assisted reproduction: A case-Control Study. *J Assisted Reprod Genet* 1997;14:10:575-580.

87. Dhont M, De Sutter P, Ruysinck G, Martens G, Bekaert A. Perinatal outcome of pregnancies after assisted reproduction : a case control study. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:688-95.

88. Dicker P, Levy T, Askhenazi J, Dekel A, Feldberg D, Ben-Rafael Z. severe abdominal complications after transvaginal ultrasound guided retrieval of oocytes for in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1993;59:1313-15.

89. Dimitry ES, Oskarsson T, Conaghan J, Margara R, Winston RM. Beneficial effects of 1 24 delay in human chorionic gonadotropin administration during in-vitro fertilization treatment cycles. *Hum Reprod* 1991;6:944-48.

90. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364:1405-10.

91. Edwards RG, Lobo R, Bouchard P. Time to revolutionize ovarian stimulation.

Hum Reprod 1996;11:917.

92. Edwards RG, Mettler L, Walters DC. Identical twins and in vitro fertilization. *Journal of In Vitro fertilization and Embryo Transfer* 1986; 3:114-117.
93. Edwards RG, Beard HK. Is the success of human IVF more a matter of genetics and evolution than growing blastocyst? *Hum Reprod* 1999;14:1.
94. Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK. Intracellular pH of mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum Reprod* 1998;13:3441.
95. Egbase PE, Al-Sharhan M, Grudzinskas JG. Influence of position and length of the uterus on implantation and clinical pregnancy rates in IVF and embryo transfer treatment cycles. *Hum Reprod* 2000;15:1943-1946.
96. Elliott M, Bayly R, Cole T, Temple IK, Maher ER. Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 cases. *Clin Genet* 1994;46:168-174.
97. El-Shawarby SA, Ravhon A, Skull J, Ellenbogen A, Trew G, Lavery S. A prospective randomized controlled trial of Wallace and Rocker embryo transfer catheters. *Reprod Biomed Online* 2008;17(4):549-52.
98. Engmann L, Manonochie N, Tan SL, Bekir J. Trends in the incidence of births and multiple births and factors that determine the probability of multiple births after IVF treatment. *Hum Reprod* 2002;16:2598.
99. Ericson A, Kallen B. Congenital malformations in infants born after IVF: a population based study. *Hum Reprod* 2001;16:504-509.
100. ESHRE. Cited 06.07.2012. <http://www.eshre.eu/ESHRE/English/Press-Room/Press-releases/Press-releases-2012/5-million-babies/page.aspx>. 1606.
101. ESHRE PGD Consortium Committee. ESHRE preimplantation genetic diagnosis consortium: data collection VI. *Hum Reprod* 2007;22:323-36.
102. The European Middle East Orgalutran Study Group. The comparable clinical outcome using the GnRH antagonist ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH surges in women undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod* 2001;16:664.
103. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Rocchetta G, Giotti PM et al. Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169:39-42.
104. Fanchin R, Aoyobi JM, Righini C, Olivennes F, Schonauer LM, Frydman R. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2001;16:1115.
105. Fanchin R, Cunha-Fillo JS, Schonauer LM, Kadoch IJ, Cohen-Bacri P, Frydman R. Coordination of early antral follicles by luteal estradiol administration provides a basis for alternative controlled ovarian hyperstimulation regimens. *Fertil Steril* 2003;79:316.
106. Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Taylor S, de Ziegler D, Frydman R. Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998;13:1968.
107. Fanchin R, Harmas A, Benaoudia F, Lundkvist U, Olivennes F, Frydman R. Microbial flora of the cervix assessed at the time of the embryo transfer adversely affects in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1998;70:866.

108. Fanchin R, Cunha-Fillo JS, Schonauer LM, Righini C, de Ziegler D, Frydman R. Luteal estradiol administration strengthens the relationship between day 3 follicle-stimulating hormone and inhibin B levels and ovarian follicular status. *Fertil Steril* 2003;79:585.
109. Fanchin R, Salomon I, Castelo-Branco O, Olivennes F, Frydman N, Frydman R. Luteal estradiol pre-treatment coordinates follicular growth during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists. *Hum Reprod* 2003;18:2698.
110. Fasoulitiotis SJ, Laufer N, Sabbagh-Ehrlich S, Lewin A, Hurwitz A, Simon A. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist versus GnRH agonist in ovarian stimulation of poor responders undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet* 2003;20:455.
111. Fedder J, Loft A, Parner e.T, Rasmussen S, Pinborg A. neonatal outcome and congenital malformations in children born after ICSI with testicular or epididymal sperm: a controlled national cohort study. *Hum Reprod* 2013;28:230-240.
112. Feichtinger W. Transvaginal oocyte retrieval. In Chervenak EA, Isaacson GC, Campbell S. (Eds). *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 1993; 1397-406. London, Little, Brown and Company.
113. Feichtinger W. Follicle aspiration with three-dimensional digital imaging (Voluson): a step toward real-time puncturing under three-dimensional ultrasound control. *Fertil Steril* 1998;70:347-77.
114. Feichtinger W, Putz M, Kemeter P. New aspects in vaginal ultrasound in an vitro fertilization program. *Ann N Y Acad Sci* 1988;541:125-30.
115. Felberbaum RF, Albano C, Ludwig M, Riethmuller-Winzen H, Grigat M, Devroey P, Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K. use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproductive technologies compared to the long protocol. Meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2001;265:175.
116. Fernando D, Halliday J.L, Breheny S, Healy Lindsay D. Outcomes of singleton births after blastocyst versus nonblastocyst transfer in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2012;97 (3):579-584.
117. Fiorentino A, Biricik A, Karadayi H, et al. Development and clinical application of a strategy for preimplantation genetic diagnosis of a single gene disorders combined with HLA matching. *Mol Hum Reprod* 2004;10:445-460.
118. Fishel S, Antinori S, Jackson P, Johnson J, Rinaldi L. Presentation of six pregnancies established by sub-zonal insemination (SUZI). *Hum Reprod* 1991;6:124.
119. Fitzsimmons BP, Bebbington MW, Fluker MR. Perinatal and neonatal outcomes in multiple gestations. Assisted reproduction versus spontaneous conceptions. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1162-7.
120. Fluker M, Grifo J, Leader A, Levy M, Meldrum D, Muasher SJ, Rinehart J, Rosenwaks Z, et al. Efficacy and safety of ganirelix acetate versus leuprolide acetate in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 2001;75:38.
121. Franco JR, Martins AMVC, Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Felipe V et al. Best site for embryo transfer; the upper or lower half of endometrial cavity? *Hum Reprod* 2004;19(8):1785-90.
122. Franco JR, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online* 2008;17:42-5.

123. Frankfurter D, Silva CP, Mota F, Trimbachi JB, Keefe D. The transfer point is a novel measure for embryo placement. *Fertil Steril* 2003;79:878-882.
124. Friedler S, Schenker JG, Herman A, Lewin A. The role of ultrasonography in evaluation of endometrial receptivity following assisted reproductive treatment: a critical review. *Hum Reprod* 1996;2:323-35.
125. Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Soffer Y, Komarovsky D, Ron-El R. Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997;12:1488.
126. Frydman R. GnRH antagonists in natural cycles. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2004;33:46-49.
127. Fujii M, Matsuoka R, Bergel E, van der Poel S, Okai T. Perinatal risk in singleton pregnancies after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2010;94:6:2113-2117.
128. Fulka J, Kalab P, First NL, et al. Damaged chromatin does not prevent the exit from metaphase I in fused mouse oocytes. *Hum Reprod* 1998;12:2473-2476.
129. Gardner DK, Lane M. Embryo culture. In: Gardner DK, Weissman A, Howles C, Shonam Z, eds. *Textbook of Assisted Reproductive Technologies*, Martin Dunitz, London, 2001, 17.
130. Gardner DK, Pool TB, Lane M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Seminars Reprod Med* 2000;18:205.
131. Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 1996;65:349.
132. Gardner DK. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 1998;49:83.
133. Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2004;81:551.
134. Gearon CM, Taylor AS, Forman RG. Factors affecting activation and fertilization of human oocytes following intracytoplasmic injection. *Hum Reprod* 1995;10:895.
135. Gelety TJ, Pearlstone AC, Surrey ES. Short-term endocrine response to gonadotropin-releasing hormone agonist initiated in the early follicular, midluteal or late luteal phase in normally cycling women. *Fertil Steril* 1995;64:1074.
136. Genbachev OD. Trophoblast L-selectin mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 2003;299 (5606):405-408.
137. Ghazzawi IM, Sharraf M, Alhasani S. Children born after ICSI: are we altering sex ratio. *Int J Gynecol Obstet* 2000;70 (suppl2):B66.
138. Giudice F, Crisci C, Eshkol A, et al. Composition of commercial gonadotrophin preparations extracted from human post-menopausal urine: characterisation of non-gonadotrophin proteins. *Hum Reprod* 1994;9:2291-2299.
139. Gonen Y, Calderon M, Dorenfeld M, Abramovici H. The impact of sonographic assessment of the endometrium and metoculous hormonal monitoring during natural cycles in patient with failed donor insemination cycles. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1991;1:122-26.

140. Gonen Y, Casper RF. Prediction of implantation by the sonographic appearance of the endometrium during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF). *J In Vitro Fertil Embryo Transf* 1990;7:146-152.
141. Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet* 2003;361:1975-1977.
142. Goudas VT, Hammitt DG, Damario DA, Session DR, Singht AP, et al. Blood on the embryo transfer catheter is associated with decreased rates of embryo implantation and clinical pregnancy with the use of in vitro fertilization embryo transfer. *Fertil Steril* 1998;70:878-882.
143. Gurgan T, Urman B, Yarali H, Kinsnisci HA. The results of in vitro fertilization-embryo transfer in couples with unexplained infertility failing to conceive with superovulation and intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1995;64:93.
144. Handsyde AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston JM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344:768-70.
145. Hansen M, Kurinczuk J.J, Bower C, Webb S. The risk of Major Birth Defects after Intracytoplasmic sperm Injection and in Vitro fertilization. *N Engl J Med* 2002;346:725-730.
146. Hansen M, Kurinczuk JJ, de Klerk N, Burton P, Bower C. Assisted reproductive Technology and major Birth defects in Western Australia. *Obstet Gynecol* 2012;120:852-863.
147. Hartmann S, Bergmann M, Bohle RM, Weidner W, Steger K. Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 2006;12 (6):407-11.
148. Harton G, Traeger-Syndinos, Goosens V. Session 41: data from the ESHRE PGD Consortium. O-150", *Human Reprod* 2012;27(suppl2):i58.
149. Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen-Bacrie P, Tesarik J. High magnification ICSI overcomes paternal effects resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006;12:19-25.
150. Hearn-Stokes RM, Miller BT, Scott I, Creuss D, Charabarty PK, Segars JH. Pregnancy rates after embryo transfer depend on the provider at embryo transfer. *Fertil Steril* 2000;74:80-6.
151. Hedon B, Out HJ, Hughes JN, et al. Efficacy and safety of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon) in infertile women pituitary-suppressed with triptorelin undergoing in vitro fertilization: a prospective, randomized, assessor-blind, multicentre trial. *Hum Reprod* 1995;10:3102-3106.
152. Helmerhorst F.M, Perquin D.A, Donker D, Keirse M.J. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *Br J Med* 2004;328:261.
153. Henningsen AK, Pinborg A, Lidegaard O, Vestergaard C, Forman JL, Andersen AN. Perinatal outcome of singleton siblings born after assisted reproductive technology and spontaneous conception: danish national siblings cohort study. *Fertil Steril* 2011;95:959-963.
154. Higgins C. Eulogies. *Reprod Biomed Online* 2013;27:767-769.
155. Hill ML, Nyberg DA. Transvaginal sonography guided procedures. In Nyberg DA, Hill LM, Bohum-Velez M, Mendelson EB. (Eds). *Transvaginal ultrasound*

1992;319-29. St Louis: Mosby Year Book.

156. Hindryckx A, Peeraer K, Debrock S, Legius E, de zegher F, Francois I, Vanderschueren D, et al. Has the prevalence of congenital abnormalities after intracytoplasmic sperm injection increased? The Leuven data 1994-2000 and a review of the literature. *Gynecol Obstet Invest* 2010; 70:11-12.

157. Horne R, Bishop CJ, Reeves G, Wood C, Kovacs GT. Aspiration of oocytes for in vitro fertilization. *Hum Reprod Update* 1996;2:77-85.

158. Hughes EG, Fedorkow DM, Daya S, Sagle MA, Van de Koppel P, Collins JA. The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 1992;58:888.

159. Huszar G. Conception, a successful cross-talk between sperm and oocyte. How to select sperm that speaks the language? In Radunovic N (Ed). *Cross talk, From cell to human*. Belgrade 2011, Sanimex, Belgrade, Serbia, 2011.

160. Ingerslev HJ, Hojgaard A, Hindkjaer J, Kesmodel U. A randomized study comparing IVF in unstimulated cycle with IVF following clomiphene citrate. *Hum Reprod* 2001; 16:696.

161. Isaksson R, Gissler M, Titinen A. Obstetric outcome among women with unexplained infertility after IVF. A matched case-study. *Hum Reprod* 2002;17:1755-61.

162. Istkovitz-Eldor J, Kol S, Mannaerts B. Use of single bolus of GnRH antagonist ganirelix treatment in women undergoing ovarian stimulation for assisted reproduction, with special reference to the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: preliminary report. *Hum Reprod* 2000;15:1956.

163. Jacob S, Moley KH. Gametes and embryo epigenetic reprogramming affect developmental outcome: implications for assisted reproductive technologies. *Pediatr Res* 2005;58:437-446.

164. Jackson RA, Gibson KA, Wu YW, Croughan MS. Perinatal outcome in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2004;103:551-563.

165. Janzen N, Goldstein M, Schlegel PN, Palermo GD, Rosenwaks Z, Hariprasad J. Use of electively cryopreserved microscopically aspirated epididymal sperm with IVF and intracytoplasmic sperm injection for obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2000;74:696.

166. Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol* 1989;142:62.

167. Jaroudi KA, Hollanders JMG, Sieck UV, et al. Pregnancy after transfer of embryos which were generated from in vitro matured oocytes. *Hum Reprod* 1997;12:875-859.

168. Johnson DS, Cinnioglu C, Ross R, et al. Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophoblast and inner cell mass. *Molec Hum Reprod* 2010;16:944-949.

169. JOINT SOGS-CFAS. Guidelines for the number of embryos to transfer following in vitro fertilization No 182, September 2006. *Int J Gynaecol Obstet* 2008;102:203-16.

170. Jones WR, Haines CJ, Matthews CD, Kirby CA. Traumatic ureteric obstruction secondary to oocyte recovery for in vitro fertilization: a case report. *J Vitro Fertil Embryo Transfer* 1985;6:185-187.
171. Junien C. Beckwith-Wiedemann syndrome, tumorigenesis and imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 1992;2:431-438.
172. Kallen B, Finnstrom O, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG, Otterblad Olausson P. Trends in delivery and neonatal outcome after in vitro fertilization in Sweden: data for 25 years. *Hum Reprod* 2010;25:1026-1034.
173. Kallen B, Olausson PO, Nygren KG. Neonatal outcome in pregnancies from ovarian stimulation. *Obstet Gynecol* 2002;100:414-419.
174. Karacan M, Erkan H, Karabulut O, Sarikamis B, Camlibel T, Benhabib M. Clinical pregnancy rates in IVF program. Use of flare-up protocol after failure with long-regimens of GnRH-a. *J Med Reprod* 2001;46:485.
175. Karande V, Morris R, Rinehart J, Miller C, Rao R, Gleicher N. Limited success using the "flare" protocol in poor responders in cycles with low basal follicle-stimulating hormone levels during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1997;67:900.
176. Karande VC, Morris R, Chapman C, Rinehart J, Gleicher N. Impact of physician factor on pregnancy rates in a large assisted reproductive technology program: do too many cooks spoil the broth? *Fertil Steril* 1999;71:1001-9.
177. Katalinic A, Rosch C, Ludwig M, for German ICSI Follow-Up Study Group. Pregnancy course and outcome after intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-a controlled, prospective cohort study. *Fertil Steril* 2004;81:1604-1616.
178. Katayama P, Stehnik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003;80:223-4.
179. Katz-Jaffe MG, Trounson AO, Cram DS. Chromosome 21 mosaic human preimplantation embryos predominantly arise from diploid conceptions. *Fertil Steril* 2005;84:634-643.
180. Katz-Jaffe MG, McReynolds S, Gardner DK, Schoolcraft WB. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Molecular Human Reprod* 2009;15:271-277.
181. Kim Huang S, Yoon JH, Jang JM, Oh HS, Lee YL, Lee WD, Yoon SH, Lim Ho J. Comparison between intracytoplasmic sperm injection and intracytoplasmic morphologically selected sperm injection in oligo-astheno-teratozoospermia patients. *Clin exp Reprod Med* 2014;41:9-14.
182. Khalifa F, Brzynski RG, Oehninger S, Acosta AA, Mnasdher SJ. Sonographic appearance of the endometrium: the predictive value for the outcome of in vitro fertilization in stimulated cycles. *Hum Reprod* 1992;7:677-80.
183. Khelada E, Ghani R. Bilateral ovarian abscess following transvaginal oocyte retrieval for IVF: a case report and review of literature. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:143-5.
184. Khalaf Y, Braude P. Curing empty follicle syndrome. *Hum Reprod* 1997;12:1601.
185. Khonelidze N, Tsaqareischilli GG, Koiava MA, Osidze KR. The role of ultrasound scanning of endometrium in the superovulation program during in vitro fertilization and embryo transfer. *Georgian Med News* 2005;(124-125):20-2.
186. Klemetti R, Gissler M, Hemminki E. Comparison of perinatal health of children

- born from IVF in Finland in the early and late 1990s. *Hum Reprod* 2002;17:2191-2198.
187. Knoester M, Helmerhorst FM, Vanderbrouche JP, van der Westeriaken LA, Walther FJ, Veen S. Perinatal outcome, health, growth, and medical care utilization of 5- to 8-years of intracytoplasmic sperm injection singletons. *Fertil Steril* 2008;89:1133-46.
188. Koivurova S, Hartikainen AL, Gissler M, Hemminki E, Sovio U, Jarvelin MR. Neonatal outcome and congenital malformations in children born after in vitro fertilization. *Hum Reprod* 2002;17:1391-8.
189. Kolibianakis E, Zikopoulos K, Albano C, Kamus M, Tournaye H, Van Steirteghem A, Devroey P. Reproductive outcome of polycystic ovarian syndrome patients treated with GnRH antagonist and recombinant FSH for IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online* 2003;7:313.
190. Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009;21:270-274.
191. Koudstaal J, Braat DDM, Bruinse HW, Naaktegeboren N, Vermeiden JPW, Visser GHA. Obstetric outcome of singletons pregnancies after IVF: A matched controlled study in four Dutch university hospitals. *Hum Reprod* 2006;15:1819-1825.
192. Koudstaal J, Bruinse HW, Helmerhorst FM, Vermeiden JP, Willemsen WN, Visser GH. Obstetric outcome of twin pregnancies after IVF: a matched controlled study in four Dutch university hospitals. *Hum Reprod* 2000;15:935-40.
193. Kowalik A, Barmat L, Damario M, Liu HC, Davis O, Rosenwaks Z. Ovarian estradiol production in vivo. Inhibitory effect of leuprolide acetate. *J Reprod Med* 1998;43:413.
194. Knez K, Tomazevic T, Zorn B, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improves development and quality of preimplantation embryos in teratozoospermia parents. *Reproductive Biomed Online* 2012;25:168-179.
195. Kuczynski W, Dhont M, Grygoruk C, Grochowski D, Wolczynski S, Szymatowicz M. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa—a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2001;16:2109-2113.
196. Kuliev A, Verlinsky Y. Place of preimplantation diagnosis in genetic practice. *Am J Med Genet* 2005;134:105-110.
197. Kuliev A, Rechinsky S, Verlinsky O. Preimplantation diagnosis of thalassemyias. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:219-225.
198. Kyono K. Evidence based Oocyte aspiration and Embryo transfer. *J Mamm Ova Res* 2005;22:13-19.
199. Laiwani S, Timmreck L, Friedman R, Penzias A, Alper M, Reindollar RH. Variations in individual physician success rates within an in vitro fertilization program might be due to patient demographics. *Fertil Steril* 2002;81:944.
200. Lambers MJ, Groenveld E, Hoozemans DA, Schats R, Homburg R, Lambalk CB, Hompes P.G.A. Lower incidence of hypertensive disorders during pregnancy in patients treated with low dose aspirin during in vitro fertilization and early pregnancy. *Hum Reprod* 2009;24:2447-2450.
201. Lane M. Mechanism for managing cellular and homeostatic stress in vitro.

Theriogenology 2001;55:225.

202. Lane M, Gardner DK. Aminoacids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum Reprod* 1998; 13:991.

203. Langley MT, Marek DM, Gardner DK, Doody KM, Doody KJ. Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments. *Hum Reprod* 2001;16:902.

204. le Cotonnec JY, Porchet HC, Beltrami V, Munafo A. Clinical pharmacology of recombinant human luteinizing hormone:Part II.Bioavailability of recombinant human luteinizing hormone assessed with an immunoassay and an in vitro bioassay. *Fertil Steril* 1998;69:195.

205. Lenton EA, Woodward B. Natural cycle versus stimulated-cycle IVF: is there a role for IVF in the natural cycle? *J Assist Reprod Genet* 1993;10:406-408.

206. Lenz. Ultrasound- guided follicle puncture under local anesthesia. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1984;1:239-43.

207. Leroy I, D'Acremont MF, Brailly-Tabard S, Frydman R, de Mouzon J, Bouchard P. A single injection of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist (Cetrorelix) postpones the luteinizing hormone (LH) surge:further evidence for the role of GnRH during the LH surge. *Fertil Steril* 1994;62:461.

208. Lesny P, Kilick SR, Robinson J, Raven G, Maguines SD. Junctional zone contractions and embryo transfer:is it safe to use a tenaculum? *Hum Reprod* 1999;14:2367-70.

209. Lie RT, Lyndstadass A, Orstavik KH, Bakketeig LS, Jacobsen G, Tanbo T. Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF methods:a meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2005;34:696-701.

210. Lim D, Bowdin Sc, Tee L, et al. Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 2009;24:741-44.

211. Liu J, Nagy PZ, Tornaye H, et al. Intracytoplasmic sperm injection does not require special treatment of the spermatozoa. *Hum Reprod* 1994;9:1127-30.

212. Lobo RA. Potential options for preservation of fertility in women. *N Engl J Med* 2005;353:64-73.

213. Ludwig M, Doody KJ, Doody KM. Use of recombinant human chorionic gonadotropin in ovulation induction. *Fertil Steril* 2003;79:1051.

214. Ludwig M, Katalinic A, Banz C, Schroder AK, Loning M, Weiss JM, Diedrich K. Tailoring the GnRH antagonist cetrorelix acetate to individual patients needs in ovarian stimulation for IVF: results of prospective, randomized study. *Hum Reprod* 2002;17:2842.

215. Malone FD, D'Alton ME. Multiple gestations:Clinical characteristics and management.In Creasy RK, Resnik R, eds. *Maternal-Fetal Medicine*.4th Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, United States, 1999.

216. Malvivalvatn S, deCherney A, Segars O. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2009;91 (2):305-315.

217. Mahony MC, Blackmore PF, Bronson RA, Alexander NJ. Inhibition of human sperm zona pellucida tight binding in the presence of antisperm anti-body positive polyclonal patient sera. *J reprod immunol* 1991;19:287.

218. Malter HE, Cohen J. Partial zona dissection of the human oocyte: a non-traumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1989;51:139.
219. Maman E, Lunenfeld E, Levy A, Vardi H, Potaschnik G. Obstetric outcome of singleton pregnancies conceived by in vitro fertilization and ovulation induction compared with those conceived spontaneously. *Fertil Steril* 1998;70:240-245.
220. Mansour RT, Aboulghar MA. Optimizing the embryo transfer technique. *Hum Reprod* 2002;17:1149.
221. Martinez MC, Mendez C, Ferro J, Nicolas M, Serra V, Landeras J. Cytogenetic analysis of early nonviable pregnancies after assisted reproduction treatment. *Fertil Steril* 2010;93:289-292.
222. Masterbroeck S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007;357:9-17.
223. Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Franco JS. Comparison on day 2 embryo quality after conventional ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection IMSI using syblings oocyte. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;150:42-6.
224. Mc Arthur SJ, Leight D, Marschall JT, Gee AJ, de Boer KA, Jansen RPS. Blastocyst trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic diagnosis from familial monogenic disorders and chromosomal translocations. *Prenatal Diagnosis* 2008;28:434-442.
225. Mc Donald S, Han Z, Mulla S, Murphy KE, Beyena J, Ohlsson A, on the behalf of the Knoeledge Synthesis group. Preterm birth and low birth weight among in vitro fertilization singletons: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;146:138-148.
226. Mc Faul P, Patel N, Mills J. An audit of obstetric outcome of 148 consecutive pregnancies from assisted conception: implications for neonatal services. *Br J Obstet Gynecol* 1993;100:820-5.
227. McFadden DE, Langlois C. Parental and meiotic origin of triploidy in the embryonic and fetal period. *Clin Genet* 2000;58:192.
228. McIlveen M, Lok FD, Pritchard J, Lashen H. Modern embryo transfer catheters and pregnancy outcome: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2005;84(4):996-1000.
229. McReynolds S, Vanderlinden L, Stevens J, Hansen K, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Lipocalin-1. A potential marker for non-invasive aneuploidy screening. *Fertil Steril* 2011;95:2631-2633.
230. Meldrum D. GnRH agonists as adjuncts for in vitro fertilization. *Obstet Gynecol* 1989;44:314.
231. Meldrum DR, Wilot A, Yee B, Garzo G, Yeo L, Hamilton F. Assisted hatching reduces the age related decline in ivf outcome in women younger than age 43 without increasing miscarriage or monozygotic twinning. *Jouran of Assisted Reproduction and Genetics* 1998; 15:418-21.
232. Meldrum DR, Wisot A, Hamilton F, Gutlay AL, Huynh D, Kempton W. Timing of initiation and dose schedule of leuprolide influence the time course of ovarian

- suppression. *Fertil Steril* 1988;50:400.
233. Meldrum DR, Chetkowski R, Steingold KA, de Ziegler D, Cedars MI, Hamilton M. Evolution of a highly successful in vitro fertilization embryo transfer program. *Fertil Steril* 1987;64:382-9.
234. Menezo YJ. Paternal and maternal factors in preimplantation embryogenesis: intereactions with the biochemical enviroment. *Reprod Biomed Online* 2006;12:616-21.
235. Merce LT. Ultrasound markers of implantation. *Ultrasound Rev Obstet Gynecol* 2002;2:110-23.
236. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;26:2658-2671.
237. Milachich T. New advances of preimplantation and prenatal genetic screening and noninvasive testing as a potential predictor of healt status of babies. *BioMed Researc Intern* 2014. ID 306505.
238. Miller JE, Smith TT. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro. *Hum Reprod* 2001;16:918.
239. Minakami H, Sayama M, Honma Y, Matsubara S, Koike T, Sato I, Uchida A, et al. Lower risks of adverse outcome in twins conceived by artifitial reproductive techniques compared with spontaneously conceived twins. *Hum Reprod* 1998;13:2005-8.
240. Moini A, Riazi K, Amid V, Ashrafi M, Tehraninejad E, Madani T, Owi M. Endometriosis may contribute to oocyte retrieval-induced pelvic inflamamatory disease:report of eight cases. *J Assist Reprod Med Genet* 2005;22:307-9.
241. Moll AC, Imhof SM, Cruysberg JR, Schouten-van Meeteren AY, Boers M, van Leeuwen FE. Incidence of retinoblastoma in children born after in vitro fertilisation. *Lancet* 2003;361:309-310.
242. Mongiu AK, Helfand BT, Kielb SJ.Ureterovaginal fistula formation after oocyte retrieval.*Urology* 2009;73:444-53.
243. Moore T.R. Diabetes in pregnancy. In Creasy R, Resnik R. (Ed). *Maternal-Fetal Medicine*.4Th Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1999, 964-995.
244. Mukaida T, Takahashi K, Goto K, Oka C. Perinatal outcome of vitrified human blastocysts in 9 year experience (3601 attemped cycles) including the incidence rate of monozygotic twinning. ESHRE, Amsterdam, 2009, Abstract book, Human Reproduction 2009; 24:O 072, I 28, Netherlands, 2009.
245. Munne S, Sandalinas M, Escudero, et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003;7:91-7.
246. Munne S. Chromosomal abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos.*Reprod Biomed Online* 2006;12:234-253.
247. Munne S, Magli C, Adler A, Wright G, de Boer K, Mortimer D, Tucker M, Cohen J, Gianarolli L. Treatment related chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod* 1997;12:780-84.
248. Nassar AH, Usta IM, Rechdan JB, Harb TS, Adra AM, Abu Nusa AA.Pregnancy outcome in spontaneous twins versus twins who were conceived through in vitro

- fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:513-8.
249. Nelissen EC, Dumoulin JC, Daunay A, Evers JL, Tost J, van Montfoort AP. Placentas from pregnancies conceived by IVF/ICSI have a reduced DNA methylation level at H19 and MEST differentially methylated regions. *Hum Reprod* 2013;28:1117-1126.
250. Nelson SM, Lawlor DA. Predicting live birth, preterm delivery, and low birth weight in infants born from in vitro fertilization: a prospective study of 144018 treatment cycles. *PloS Med* 2011; 8e 1000386.
251. Nikolettos N, Al-Hassani S, Felberbaum R, Demirel LC, Kupker W, Montzka P, Xia YX, et al. Gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol: a novel method of ovarian stimulation in poor responders. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;97:2002.
252. Nijis M, Geerts L, Van Roosendaal, et al. Prevention of multiple pregnancies in an vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1993;59:1245-50.
253. Nouri K, Ott J, Stoegbauer L, Petrowski D, Frantal S, Walch k. Obstetric and perinatal outcomes in IVF versus ICSI-conceived pregnancies at a tertiary care center-a pilot study. *Reprod Biol and Endocrinol* 2013;11:84.
254. Nyboe-Andersen A, Gianarolli L, Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe, 2000. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2004;19:490.
255. Ng EH, Chui DK, Tang OS, Lau EY, Yeung WS, Chung HP. In vitro fertilization and embryo transfer during natural cycles. *J Reprod Med* 2001;46:95.
256. Oehninger S, Mayer J, Muasher S. Impact of different clinical variables on pregnancy outcomes following embryo cryopreservation. *Moll Cell Endocrinol* 2000;169:73-77.
257. Ochsenkuhn R, Strowitski T, Gurtner M, Strauss A, Schulze A, Hepp H, Hillemanns P. Pregnancy complications, obstetric risks and neonatal outcome in singleton and twin pregnancies after GIFT and IVF. *Arch Gynecol Obstet* 2003;268:256-261.
258. Olijve W, de Boer W, Mulders JWM, et al. Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Mol Hum Reprod* 1996;2:371-382.
259. Olivennes F, Diedrich K, Frydman R, Felberbaum RE, Howles CM. Safety and efficacy of a 3mg dose of the GnRH antagonist cetrorelix in preventing premature LH surges: report of the two large, multicentre, multinational, phase IIIb clinical experiences. *Reprod Biomed Online* 2003;6:432.
260. Olivennes F. Do children born after assisted reproductive technology have a higher incidence of birth defects? *Fertil Steril* 2005;84:1325-1326.
261. Olivennes F, Alvarez S, Bouchard P, Fanchun R, Salat-Baroux J, Frydman R. The use of GnRH antagonist (cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 vs 2 mg. *Hum Reprod* 1998;13:2411.
262. Olivennes F, Belaisch-Allart J, Emperaire JC, Dechaund H, Alvarez S, Mereau L, Nicollet B, Zorn JR et al. Prospective, randomized, controlled study of in vitro fertilization -embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone releasing (LH-RH) antagonist (cetrorelix) or a depot formula of an LH-RH agonist triptorelin.

Fertil Steril 2000;73:314.

263. Olivennes F, Diedrich K, Frydman R, Felberbaum RE, Howles CM. safety and efficacy of a 3mg dose GnRH antagonist cetrorelix in preventing premature LH surge: report of two large, multicentre, multinational, phase IIIb clinical experiences. *Reprod Biomed Online* 2003; 6:432.

264. Olivennes F, Cunha-Filho JS, Fanchin R, Bouchard P, Frydman R. The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation. *Hum Reprod Update* 2002; 8:279.

265. Ombelet W, Cadron I, Gerris J, De Sutter P, Bosmans E, Martens G, Ruysinck G. et al. Obstetric and perinatal outcome of 1655 ICSI and 3974 IVF singleton and 1102 ICSI and 2901 IVF twins: a comparative analysis. *Reprod Biomed Online* 2005; 11:76-85.

266. Ombelet W, Martens G, De Sutter P, Gerris J, Bosmans E, Ruysinck G. et al. Perinatal outcome of 12021 singleton and 3108 twins born after non-IVF assisted reproduction: a cohort study. *Hum Reprod* 2006;21:1025-1032.

267. Orwing KE, Schlatt S. Cryopreservation and transplantation of spermatogonia and testicular tissue for preservation of male infertility. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;34:51-56.

268. Out HJ, Rutheford A, Fleming R, Tay CC, Trew G, Ledger W, Cahill D. A randomized, double-blind, multicentre clinical trial comparing starting doses of 150 and 200 IU recombinant FSH in women treated with the GnRH antagonist ganirelix for assisted reproduction. *Hum Reprod* 2004;19:90-95.

269. Owen C.M, Segars Jr J.H. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Semin Reprod Med* 2009;27:417-428.

270. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17.

271. Palini S, Galluzzi L, de Stefan, et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod BioMed Online* 2013;26:603-610.

272. Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S, Maheshwari A. obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI .A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2012; 18(5):485-503.

273. Pandian Z, Marjoribanks J, Ozturk O, Serour G, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev* 2013 jul 29;7: CD003416. Doi 10.1002/14651858.CD003416.pub4.

274. Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landryt L, Van Steirteghem A, Devroey P. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *New England Journal of Medicine* 2006;354:1139-1146.

275. Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M. Efficacy of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:13-6.

276. Pellicer A, Valbuena D, Cano F, Remohi J, Simon C. Lower implantation rates in high responders: evidence for an altered endocrine milieu during the preimplantation period. *Fertil Steril* 1996;65:1190.

277. Peramo B, Ricciarelli E, Chadro-Fernandez JM, Huguet E, Hernandez ER.

- Blastocyst transfer and monozygotic twinning. *Fertil Steril* Dec 1999; 72(6):1116-7.
278. Perdix A, Travers A, Clalot F, et al. Modification of chromosomal architecture in human spermatozoa with large vacuoles. *Andrology* 2013;1:55-66.
279. Petersen K, Homnes P.J, Ellingsen S, Jensen F, Brocks V, Starup J. et al. Perinatal outcome after in vitro fertilization. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995;74:129-31.
280. Pinborg A, Loft A, Nyboe-Anderson A. Neonatal outcome in a Danish national cohort of 8602 children born after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection: The role of twin pregnancy. *Arch Obstet Gynecol Scand* 2004; Nov 83(11):1009-11.
281. Pinborg, A-Wennerholm UB, Romundstad LB, Loft A, Aittomaki K, Soderstrom-Anttila V, Nygren KG, Hazenkamp J, Bergh C. Why do singletons after assisted reproductive technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2013;19(2):87-104.
282. Pinborg A, Loft A, Henningsen A.K.A, Rasmussen S, Nyboe Andersen A. Infant outcome of 957 singletons born after frozen embryo replacement: The danish national cohort study 1995-2006. *Fertil Steril* 2010; 94:1320-1327.
283. Pinborg A, Henningsen A.A, Loft A, Maichau S.S, Forman J, Nyboe-Andersen A. Large baby syndrome in singletons born after frozen embryo transfer (FET): is it due to maternal factors or the cryotechnique? *Hum Reprod* 2014;29:618-627.
284. Pinborg A, Henningsen A, Malchau AK, Loft A. Congenital anomalies after assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2013;99:323-327.
285. Pinkas H, Orvieto R, Avrech OM, Rufas O, Ferber A, Ben-Rafael Z, Fisch B. Gonadotropin stimulation following GnRH-priming for poor responders in in vitro fertilization-embryotransfer programs. *Gynecol Endocrinol* 2000;14:11.
286. Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in patients with unexplained recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2005;83:393-397.
287. Poikkeus P, Gissler M, Unkilla-Kallio L, Granskog-Hyden C, Tiitinen A. Obstetric and neonatal outcome after single embryo transfer. *Hum Reprod* 2007; 22:1073-1079.
288. Prakash P, Leykin L, Chen Z, Toth H, Sayegh R, Schiff I, Isaksson K. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). *Fertil Steril* 1998;69:722.
289. Prapas Y, Prapas N, Hatziparasidou A, Vanderzwalmen P, Mijs M, Prapa S, Vlassis G. Ultrasound guided embryo transfer maximizes the IVF result on day 3 and day 4 embryo transfer but has no impact on the day 5. *Hum Reprod* 2002;10 (9):1904-08.
290. Recombinant Human FSH Study Group. Clinical assessment of recombinant human follicle-stimulating hormone in stimulating ovarian follicular development before in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995; 63:77-86.
291. Reubinoff B.E, Samueloff A, Ben-Haim M, Friedler S, Schneker J. G, Lewin A. Is the obstetric outcome of in vitro fertilized singletons gestations different from natural ones? A controlled study. *Fertil Steril* 1997;67:1077-83.
292. Romundstad LB, Romundstad PR, Sunde A, von Düring V, Skjaerven R,

Gunnell D, Vatten LJ. Effects on technology or maternal factor on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study. *Lancet* 2008;372:737-743.

293. Romundstad LB, Romundstad PR, Sunde A, et al. Increased risk of placenta previa in pregnancies following IVF/ICSI: a comparison of ART and non-ART pregnancies in the same mother. *Hum reprod* 2006;21:2352-2358.

294. Rongiers-Bertrand C, Olivennes F, Righini C, Fanchin R, Taieb J, Hamamah S, Bouchard P, Frydman R. Revival of the natural cycles in in-vitro fertilization with a use of the new gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix): a pilot study with minimal stimulation. *Hum Reprod* 1999; 14:683.

295. Ron-El R, Herman A, Golan A, Soffer Y, Nachum H, Caspi E. Ultrashort gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-a) protocol in comparison with long-acting GnRH protocol and menotropin alone. *Fertil Steril* 1992;58:1164.

296. Sahla O, Dada T, Levett S, Allgar V, Sharma V. The influence of supernumerary embryos on clinical outcome of IVF cycles. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:335.

297. Sallam HN, Agameya AF, Rahman AF, Ezzeldin F, Sallam AN. Ultrasound measurement of the uterocervical angle before embryo transfer: a prospective controlled study. *Hum Reprod* 2002;17(7):1767-1772.

298. Sazonova A, Kallen K, Thurin-Kjellberg A, Wennerholm U.B, Bergh C. Factors affecting obstetric outcome of singletons born after IVF. *Hum Reprod* 2011;26 (10):2878-2886.

299. Sazonova A, Kallen K, Thurin Kjellberg A, Wennerholm UB, Bergh C. Obstetric outcome after in vitro fertilization with single or double embryo transfer. *Hum Reprod* 2011;26:442-450.

300. Schachter M, Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Bern O, Ron-el R. Improvement of IVF outcome in poor responders by discontinuation of GnRH analogue during the gonadotrophin stimulation phase-a function of improved embryo quality. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:197.

301. Schieve LA, Ferre C, Peterson HB et al. Perinatal outcome among singleton infants conceived through assisted reproductive technology in the United States. *Obstet Gynecol* 2004;103:1144-1153.

302. Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, et al. Low and very low birthweight in infants conceived with the use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med* 2002;72:156-60.

303. Schoolcraft WB, Gardner DK. Blastocyst culture and transfer increases the efficacy of oocyte donations. *Fertil Steril* 2000;74:842.

304. Schoolcraft WB, Surrey Es, Gardner DK. Embryo transfer techniques and variables affecting success. *Fertil Steril* 2001;76:863.

305. Scott RT, Navot D. Enhancement of ovarian responsiveness with microdoses of gonadotropin-releasing hormone agonist during ovulation induction of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1994;61:880.

306. Schutte JM, Schuitemaker NW, Van Roosemalen J, Steegers EA. Substandard care in maternal mortality due to the hypertensive diseases in pregnancy in the Netherlands. *BJOG* 2008;115:732-736.

307. Schats R, De Sutter P, Bassil S, Kremer JAM, Tornaye H, Donnez J on the behalf of the Feronia and Apis study group. Ovarian stimulation during assisted

reproduction treatment: a comparison of recombinant and highly purified urinary human FSH. *Hum Reprod* 2000;15:1691-1697.

308. Seeho KM, Burton G, Leight J, Marshall JT, Persson JW, Moriss JM. The role of preimplantation genetic diagnosis in the management in severe rhesus alloimmunisation: first unaffected pregnancy: case report. *Hum Reprod* 2005;20:697-701.

309. Sereffini P, Batfozin J, Nelson J, Olive D. Sonographic uterine predictors of pregnancy in women undergoing ovulation induction for assisted reproductive treatment. *Fertil Steril* 1994;62:815-22.

310. Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Danneshmand ST. Influence of patient age on the growth and transfer of blastocyst-stage embryos. *Fertil Steril* 2002;77:700-705.

311. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipschultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* 2002;77:873.

312. Sher G, Hebert C, Mascassarani G, Jacobs HM. Assessment of the late proliferative phase endometrium by ultrasonography in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *Hum Reprod* 1991;6:323-37.

313. Shevell T, Malone FD, Vidaver J, Porter TF, Luthy DA, Comstock CH, Hankins GD, Eddleman K, Dolan S, Dugoff L. Assisted reproductive technology and pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* 2005; 106:1039-1045.

314. Shevell T, Malone FD, Vidaver J. Assisted reproductive technology pregnancies were associated with increased risk of specific negative outcomes. Evidence-based *Obstet Gynecol* 2006;8:110-111.

315. Shih W, Rushford D.D, Bourne H, Garrett C, McBain J.C, Healy D L, Baker H.W.G. factors affecting low birthweight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection. *Hum Reprod* 2008;23:1644-1653.

316. Shrivastav P, Nadkarni P, Wensvoort S, Craft I. Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1994;9:2058.

317. Shulman A, Ben-Nun I, Ghetler Y, Kaneti H, Shilon M, Beyth Y. Relationship between embryo morphology and implantation rate after in vitro fertilization treatment in conception cycles. *Fertil Steril* 1993;60:123.

318. Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, Tornaye H, Van Steiteghem AC. Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinative failure. *Hum Reprod* 1997;12:2422.

319. Sills ES, Moomju M, Zaninovic N, Veeck LL, McGee M, Palermo GD, Rosenwaks Z. Human zona pellucida micromanipulation and monozygotic twinning frequency after IVF. *Human Reprod* 2000; 15:890-895.

320. Simon C, Garcia-Velasco JJ, Valbuena D, Peninado JA, Moreno C, Remohi J, Pellicer A. Increasing uterine receptivity by decreasing estradiol levels during the preimplantation period in high-responders with the use of a follicle-stimulating hormone down-step regimen. *Fertil Steril* 1998;70:234.

321. Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, et al. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril* 2010;94:2088-95.

322. Smith B, Porter R, Ahuja K, Craft I. Ultrasound assessment of endometrial

changes in stimulated cycles in an in vitro fertilization and embryo transfer program. *J in Vitro Fertil Embryo Transf* 1984;1:233-238.

323. Staesen C, Van Steirteghem A. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after in intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997;12:321-327.

324. Staesen C, Michiels A, Verpoest W, Van der Elst J, Liebers I, Devroey P. Does PGS improve pregnancy rates in young patients with single-embryo transfer? *Hum Reprod* 2007;22 (Suppl):i32.

325. Staesen C, Platteau P, Van Asche E, Michelis A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van SA. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004;19:2849-2858.

326. Stankovic V. Gamete preparation for intracytoplasmic sperm injection ICSI. In Micic D, Radunovic N (eds). *Assisted reproduction technology in infertility therapy*. Acta Clinica 2009;9:227-234.

327. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 1978;2:366.

328. Steptoe PC, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet* 1976;2:366.

329. Steptoe PC. Laparoscopy and ovulation. *Lancet* 1968;2:913.

330. Strickler RC, Christianson C, Crane JP, Curato A, Knight AB, Yang V. Ultrasound guidance for human embryo transfer. *Fertil Steril* 1985;43:828-61.

331. Strohmer T, Feichtinger W. Successful clinical application of laser for micromanipulation in an vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1992;58:212.

332. Stuebe AG, Mcelrath M. Tubal factor infertility is associated with an increased risk of preterm birth compared with male factor infertility. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:575.

333. Surrey ES, Bower J, Hill DM, Ramsey J, Surrey MW. Clinical and endocrine effects of a microdose GnRH agonists flare regimen administered to poor responders who are undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;69:419.

334. Sutcliffe AG, Taylor B, Saunders K, Thornton S, Lieberman BA, Grudzikas JG. Outcome in second year of live after in-vitro fertilization by intracytoplasmic sperm injection: a UK case-control study. *Lancet* 2001;357:2080-2084.

335. Takeuchi S, Minoura H, Shihara T, Shen X, Futamura N, Toyoda N. In vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection for couples with unexplained infertility after failed direct intraperitoneal insemination. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:515.

336. Tan SL, Maconochie N, Doyle P, Campbell S, Balen A, Bekir J, Brindsen P, Edwards PG, Jacobs HS. Cumulative conception and live-births rates after in vitro fertilization with or without the use of long, short, and ultrashort regimens of gonadotropin-releasing hormone agonist buserelin. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:513.

337. Tan SL, Balen A, el Hussein E, Mills C, Campbell S, Yovich J, Jacobs HS. A prospective randomized study of the optimum timing of human chorionic

gonadotropin administration after pituitary desensitization in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992;57:1259.

338. Tan SL, Doyle P, Campbell S, Beral V, Rizk B, Brinsden P, Mason B, Edwards RG. Obstetric outcome of in vitro fertilization pregnancies compared with normally conceived pregnancies. *Obstet Gynecol* 1992;167:778-784.

339. Tan SL, Biljan MM. Selection of candidates for in vitro fertilization based on color Doppler findings. In Kupesic S, de Ziegler, eds. *Ultrasound and Infertility*, London, The Parthenon Publishing Group, 155-68, 2000.

340. Thatcher SS, Restrepo U, Levy G, DeCherney AG. In-vitro fertilization and sex ratio. *Lancet* 1989;333:1025-6.

341. Tarlatzic BC, Qublan HS, Sanopoulou T, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Increase in monozygotic twinning rate after intracytoplasmic sperm injection and blastocyst stage embryo transfer. *Fertility and Sterility* 2002;77:196-198.

342. Tesarik J, Nagy P, Abdelmassih R, et al. Pharmacological concentrations of follicle stimulating hormone and testosterone improve the efficacy of in vitro germ cell differentiation in men with maturation arrest. *Fertil Steril* 2002;77:245-251.

343. Tesarik J. paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online* 2005;10:370-5.

344. Thurin A, Hausken J, Hillensjo T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, Bergh C. Elective Single embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2004;351:2392-2402.

345. Travessos DE, Park J, Zaninovic N, et al. Does time between hyaluronidase exposure and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) influence pregnancy rate? *Fertil Steril* 2001;76(suppl 1):7-8.

346. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;305:707-9.

347. Tomic V, Tomic J. Neonatal outcome of Ivf singletons versus naturally conceived in women aged 35 years and over. *Arch Obstet Gynecol* 2011;284:1411-1416.

348. Tureck RW, Garcia C, Balasco L, Mastroianni L. Perioperative complications arising after transvaginal oocyte retrieval. *Obstet Gynecol* 1993;81:590-593.

349. Turek PJ. Infections, immunology, and male infertility. *Infertil Reprod Med* 1999;10:435.

350. Ueno J, Oehninger S, Brzynski RG, et al. Ultrasonographic appearance in natural and stimulated in-vitro cycles and its correlation with outcome. *Hum Reprod* 1991;6:901-04.

351. Urbansek J, Witthaus E. Midluteal buserelin is superior to early follicular phase buserelin in combined gonadotropin-releasing hormone analog and gonadotropin stimulation in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996;65:966.

352. Uygur D, Alkan RN, Batuoglu S. Recurrent empty follicle syndrome. *J Assist Reprod Genet* 2003;20:390.

353. Vajta G, Nagy PZ. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006;12:779-96.

354. Van Heesch MJM, Evers JHL, Dumolin JCM, Van der Hoeven M.A.H.B., Van Beisterveldt C.E.M, Bonsel GJ, Dykgraaf R.H.M, Van Goudoever J.B.V, Koopman-

Esseboom C, Nelen W.L.D.M, Steiner K, Tammninga P, Tonch N, Zonne-Veld P.V, Dirksen C.D. A comparison of perinatal outcomes in singletons and multiples born after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection stratified for neonatal risk criteria. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2014;93:277-286.

355. Van del Abbel E, Camus M, Joris H, Van Steirteghem A. Embryo freezing after intracytoplasmic sperm injection. *Moll Cell Endocrinol* 2000;169:49-54.

356. Van der Ven HH, Al-Hasani S, Dietrich K, Hamerich U, Lehmann F, Krebs D. Polyspermy in in vitro fertilization of human oocytes: frequency and possible causes. *Ann NY Acad Scad* 1985;442:88.

357. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, et al. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online* 2008;17:617-27.

358. Vanderzwalmen P, Bertin G, Lejeune B, et al. Two essential steps for successful intracytoplasmic sperm injection: injection immobilized spermatozoa after rupture of the oolema. *Hum Reprod* 1996;11:540-547.

359. Vanneste E, Voed T, Mellote C, et al. What next for implantation genetic screening?. High mitotic chromosome instability rate provides the biological bases for low success rate. *Hum Reprod* 2009;24:2679-2682.

360. Verlaenen H, Cammu H, Derde MP, Amy J.J. Singleton pregnancy after in vitro fertilization: expectation and outcome. *Obstet Gynecol* 1995; 86:906-10.

361. Wang YA, Sullivan EA, Black D, Dean J, Bryant J, Chapman M. Preterm birth and low birth weight after assisted reproductive technology -related pregnancy in Australia between 1996-2000. *Fertil Steril* 2005;83:1650-1658.

362. Wang PT, Lee RK, Su JT, Hou JW, Lin MH, Hu JM. Cessation of low-dose gonadotropin releasing hormone agonist therapy followed by high-dose gonadotropin stimulation yields a favorable ovarian response in poor responders. *J Assist Reprod Genet* 2002;19:1.

363. Wang JG, Hucho Mj, Kavic S, Sauer MV. Rectus sheath hematoma after transvaginal follicle aspiration : a rare complication of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2005;84:217.

364. Wang JX, Norman RJ, Kristiansson P. The effect of various infertility treatments on the risk of preterm birth. *Hum Reprod* 2002;17:945-949.

365. Waterstone J, Parsons J, Bolton V. Elective transfer of two embryos. *Lancet* 1991;337:975-6.

366. Weissman A, Gotlieb L, Casper RF. The dentimetral effects on increased endometrial thickness on implantation and pregnancy rates and outcome in an vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1999;1:147-49.

367. Wennerholm U.B, Bergh C, Hamberger L, Lundin K, Nilsson L, Wiklnad M, Kallen B. Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. *Hum Reprod* 2000;15:944-948.

368. Wennerholm UB, Henningsen A.K.A, Romundstad L. B, Bergh C, Pinborg A, Skjaerven R, Forman J, Gissler M, Nygren K.G, Tiitinen A. Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: a Nordic cohort study from the CONARTaS group. *Hum Reprod* 2013;28:2545-2553.

369. Westergaard LG, erb K, Laursen S, Rasmussen PE, Rex S. The effects of human

menopausal gonadotrophin and highly purified, urine-derived follicle stimulating hormone on the outcome of in vitro fertilization in down-regulated normogonadotropic women. *Hum Reprod* 1996, 11:1209-1213.

370. Wickland M, Lennart E, Hamberger L. Transvesical and transvaginal approaches for the aspiration of follicles by the use of ultrasound. *Ann NY Sci* 1985;441:184.

371. Wickland M, Bergh C, Borg K, Hillensjo T, Howles CM, Knutsson A, Nilsson L, Wood M. A prospective, randomized comparison of two starting doses of recombinant FSH in combination with cetrorelix in women undergoing ovarian stimulation for IVF/ICSI. *Hum Reprod* 2001;16:1676.

372. Wiemer KE, Hoffman DI, Maxson WS, Eager S, Muhlberger B, Fiore I, Cuervo M. Embryonic morphology and the rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. *Hum Reprod* 1993;8:97.

373. Wilding M, Coppola G, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B. Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa IMSI improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:253-62.

374. Williams SC, Gibbons WE, Muascher SJ, Oehninger S. Minimal ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization using sequential clomiphene citrate and gonadotropin with or without the addition of a gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Fertil Steril* 2002;78:1068.

375. Williams CA. Neurological aspects of Angelman syndrome. *Brain Dev* 2005; 27:88-94.

376. Wilson M, Hartke K, Kiehl M, Rodgers J, Brabec S, Lyles R. Integration of blastocyst transfer for all the patients. *Fertil Steril* 2002;77:693.

377. Wilton L. preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenat Diagn* 2002;22:512-8.

378. Wickland M, Borg I, Hamberger L, et al. Simplification of IVF: minimal monitoring and the use of subcutaneous highly purified FSH administration for ovulation induction. *Hum Reprod* 1994;9:1430-1436.

379. Woldringh GH, Frunt M.H.A, Kremer J.A.M, Spaanderman MEA. Decreased ovarian reserve related to pre-eclampsia in IVF/ICSI pregnancies. *Hum Reprod* 2006;21:2948-2954.

380. Woldringh GH, Besselink DE, Tilema AH, Hendriks JCM, Kremer JAM. Karyotyping, congenital abnormalities and follow-up of children after intracytoplasmic sperm injection with non-ejaculated sperm: a systemic review. *Hum Reprod Update* 2010;16:12-19.

381. Wong CC, Loewke KE, Bossert NI, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature Biotechnology* 2010;28:1115-1121.

382. Worrilow W, Eid S, Woodhouse J, Matthews S, Khoury J, Witmyer K. Prospective, Multi-center, Double-Blind, Randomized Clinical trial evaluating the use of Hyaluronan bound sperm in ICSI: statistically significant improvement in clinical outcomes, Abstract, ASRM Annual Meeting, 2011.

383. Whirright VC, Chang J, Jeng G, Chen M, Macaluso M. Assisted reproductive technology surveillance-United States, 2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report*

Surveill Summaries 2007;56:1-22.

384. Yanaihara A, Yorimitsu T, Motoyama H, Watanabe H, Kawanura T. Monozygotic multiple gestation following in vitro fertilization: analysis of seven cases from Japan. *Journal of Experimental and Clinical Assisted Reproduction* 2007;4:4.

385. Yovich JL, Stanger JD, Gravavg A, Barter RA, Lunay G, Dawkins RL, Mulcavy MT. Monozygotic twins from in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 1984;41:833-37.

386. Zadori ZJ, Kozinsky Z, Orvos H, Katona M, Kaali SG, Pal A. The incidence of major birth defects following in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2003;20:131-132.

387. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Isihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoe S. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology; World Health Organization. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril* 2009;92:1520-1524.

388. Zhu JL, Basso O, Obel C, Bille C, Olsen J. Infertility, infertility treatment, and congenital malformations: Danish national birth cohort. *Br Med J* 2006;333:679.

389. Ziebe S, Lundin K, Janssens R, Helmgard L, Arce JC for The MERIT Group. Influence of ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patients undergoing IVF. *Hum Reprod* 2007; 22:2404-2413.

390. Zollner U, Dietl J. Perinatal risks after IVF and ICSI. *J Perinatal Med* 2013; 41:17-22.

391. Zwink N, Jenetsky E, Schiedeke E, Schmidt D, Marzheuser S, Grasshoff-Derr S, Holland-Cunz S, Weih S, et al. CURE-Net Consortium, 2012. Assisted reproductive techniques and the risk of anorectal malformations: a German case-control study. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:65.

BIOGRAFIJA

Jelena (Dušan) Stojnić je rođena 21.08.1970. godine u Beogradu. Pohađala je Osnovne škole "Branko Radičević" i "Ivo Andrić" u Beogradu. Završila je Treću beogradsku gimnaziju, prirodno- tehnički smer 1988/89.

Medicinski fakultet u Beogradu je upisala školske 1989/90 kao 33 rangirana na prijemnom ispitu. 21.05.1996. je završila Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom u toku studiranja 9.70 (devet i sedamdeset) i ocenom 10 (deset) na diplomskom radu "Frakture maksile" kod mentora prof dr Gojka Stojčića.

19.11.2001. na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu je odbranila Magistarski rad "Skrining hromozomopatija u I trimestru trudnoće metodom ultrazvuka", sa mentor Doc dr Aleksandrom Ljubićem, iz uže naučne oblasti Humana reprodukcija.

Specijalizaciju iz oblasti Ginekologije i akušerstva na Medicinskom fakultetu u Beogradu je upisala upis školske 1997/98, a završila u Beograd, 04.07.2002. godine sa ocenom 5 (odličan). Zaposlena je u Kliničkom Centru Srbije, Klinici za Ginekologiju i Akušerstvo, od 23.08.2000. godine. Na Klinici za ginekologiju i akušerstvo obavlja posao lekara specijaliste na odeljenju ART, a uža oblast je Infertilitet sa asistiranom fertilizacijom.

Na Medicinskom fakultetu u Beogradu, za oblast Ginekologija i akušerstvo je izabrana 17.11.2011 u zvanje Kliničkog asistenta, a ponovo izabrana 20.10.2014. u isto zvanje.

Poseduje aktivno znanje engleskog i ruskog jezika. Autor ili saradnik je u 88 stručno-naučnih radova. Dobitnik je nagrade "Prof Dr Žarko Pilić" Udruženja za primenu ultrasonografije u ginekologiji, perinatalogiji i reproduktivnoj medicini 2004. godine za najbolji rad pod naslovom "Značaj ultrasonografskog monitoringa embriotransfera u predikciji ishoda trudnoće".

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Jelena Stojnić

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

“Ishodi trudnoća i stanja novorođenčadi nakon primene metoda asistirane reprodukcije”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 16.02.2015.

Stojnić Jelena

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jelena Stojnić

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada "Ishodi trudnoća i stanja novorođenčadi nakon primene metoda asistirane
reprodukcije" _____

Mentor Akademik Prof. Dr Nebojša Radunović _____

Potpisani Jelena Stojnić


Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 16.02.2015.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

“Ishodi trudnoća i stanja novorođenčadi nakon primene metoda asistirane reprodukcije”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, 16.02.2015.

Potpis doktoranda



Stjepan Jelenc