

IN VITRO FERTILISERING TROMSØ
UTVIKLING AV ET BLASTOCYSTREGIME OG RESULTATER I TO
KARAKTERISTISKE PERIODER

5.årsoppgave Stadium IV – medisinstudiet i Tromsø

Eirin Haugli Falch, MK 05

Tromsø, vår 2010.

Veileder:

Kjell Bertheussen (IKM/IVF)

INNHOLDSFORTEGNELSE

1.0 Sammendrag	3
2.0 Innledning	4
2.1 Teori	4
2.2 IVF Tromsø	9
2.3 Problemstilling	10
3.0 Materiale og metode	11
4.0 Resultater	12
4.1 Behandlingscykluser og egguthenting	12
4.2 Antall oocytter hentet ut og befruktet.....	12
4.3 Blastocyster.....	12
4.4 Graviditeter	13
4.5 Spontanaborter	14
4.6 Fødsler.....	14
4.7 Alder.....	14
4.8 Indikasjoner.....	15
5.0 Diskusjon	16
5.1 Fullstendig suksessrate	16
5.2 Hormonstimulering.....	16
5.3 Fertiliseringsrate og embryoutvikling	17
5.4 Tilbakeføringer og bruk av blastocystregime	18
5.5 Tilbakeføring av ett eller flere embryo	18
5.6 Endringer i pasientpopulasjonen.....	19
6.0 Konklusjon	20
7.0 Takk	21
8.0 Tabeller.....	22
8.1 Tabell 1. Oversiktstabell begge perioder	22
8.1 Tabell 2. Embryoutvikling ved tilbakeføring dag 5, 1.periode	23
8.1 Tabell 1. Embryoutvikling ved tilbakeføring dag 5, 2. periode	23
9.0 Referanser	24

1.0 SAMMENDRAG

Bakgrunn:

In vitro fertiliseringsklinikken ved Universitetssykehuset i Nord Norge har vært sterkt delaktig i utviklingen av et regime til bruk i klinisk in vitro fertilisering som går ut på å dyrke embryo i langtidskultur i fem dager til blastocyster. Dette for å selekere de mest levedyktige embryoene for tilbakeføring ved å observere hvilke embryoer som utvikler seg best og ekskludere de som tidlig stagnerer eller går til grunne. Formålet med denne studien er å se om resultatene fra IVF-behandlingen, som antall fødsler, aborter og andel dyrkede blastocyster står i sammenheng med utviklingen av nye medier for langtidskultur.

Materiale og metode:

Dette er en retrospektiv studie som inkluderer alle par som gjennomgikk in vitro fertilisering ved IVF-klinikken i Tromsø i perioden 01.08.93-30.01.95 og året 2005.

Resultater og fortolkning:

De endelige resultatene ved IVF-klinikken i Tromsø var omtrent de samme i perioden 01.08.93-31.01.95 som i år 2005, med en fødselsrate av alle tilbakeføringer på 42% i første periode og 39% i andre periode. Pasientpopulasjonen er blitt eldre og indikasjonene for IVF behandling er tydelig endret. Særlig er andelen tubefaktor, som generelt gir høy suksessrate, langt lavere i 2005. Til tross for at pasientene er blitt eldre og vanskeligere å behandle har resultatene ikke blitt dårligere. Dette henger tett sammen med bedre kulturmedier. Forholdene for embryoene in vitro er betydelig bedret, og med de nye mediene sees en hurtigere embryovekst og bedre embryokvalitet.

2.0 INNLEDNING

2.1 Teori

Infertilitet defineres som manglende befruktning etter et år med regelmessig ubeskyttet samleie.(1) Denne definisjonen omfatter de som er sterile og aldri vil oppnå graviditet, samt subfertile som etter en tid, spontant eller som følge av behandling, blir gravide. Ufrivillig barnløshet opptrer hos cirka 10-15% av befolkningen i den vestlige verden.(2)

In vitro fertilisering (IVF) eller ”prøverørsbehandling”, som det kalles på folkemunne, er en behandlingsform for par med uoppfylt barneønske. Det første IVF-barnet ble født i 1978 i England og siden den gang har over 1,5 millioner barn kommet til verden på denne måten.(3) Det anslås at mellom en av 100 til en av 150 barn som fødes i den vestlige verden i dag er unnfanget ved hjelp av in vitro fertilisering.(4)

Årsaker til infertilitet

Årsaken til infertilitet ligger i 30% av tilfellene hos mannen, 30% av tilfellene hos kvinnen og i 30% hos begge parter.(2) I rundt 10-20% av tilfellene mislykkes utredningen i å gi en forklaring på infertiliteten.(5)

De viktigste årsakene til infertilitet er:

- tubefaktor
- uforklarlig infertilitet
- mannlig infertilitet
- ovulasjonsforstyrrelser
- polycystisk ovarialsyndrom
- endometriose

Manglende ovulasjon kan skyldes svikt eller forstyrrelse i reguleringen av hypotalamus-hypofyse-ovar aksene. Forstyrrelsen kan være primært i hypotalamus og gi manglende produksjon og sekresjon av gonadotropinfrigjørende hormon som igjen gir mangelfull sekresjon av luteiniserende hormon (LH) og follikkelstimulerende hormon (FSH) slik at ovariene ikke blir optimalt stimulert for follikkelproduksjon og ovulasjon. Hypotalamus hormonproduserende funksjon kan forstyrres av autonome

påvirkninger som blant annet ekstrem fysisk aktivitet og lav kroppsvekt, noe som ofte er årsak til infertilitet hos kvinner med disse risikofaktorene. Dette er reversibelt og ved å øke kroppsvekten vil mulighetene for graviditet også øke.

Svikten kan også skyldes patologi i hypofysen som kan føre til forstyrrelser i LH og FSH produksjon. Dette kan for eksempel være følge av et prolaktinom, hvor overproduksjon av prolaktin hemmer sekresjon av LH og FSH.

Polycystisk ovarialsyndrom er en heterogen endokrin lidelse som opptrer hos kvinner i fertil alder. Det er et metabolsk syndrom med økte serumkonsentrasjoner av luteiniserende hormon, testosteron, insulin og prolaktin. Denne hormonelle ubalansen fører til flere kliniske funn typisk for tilstanden og er mer uttalt hos enkelte. Kvinnens kroppsmasseindeks korrelerer med hirsutisme, akne, syklusforstyrrelser, infertilitet og insulinresistens med kompensatorisk hypersekresjon av insulin. Syndromet kan komme til uttrykk når polycystiske ovarier ”stresses” enten ved overstimulering av insulin, som når overvekt utvikles eller ved gonadotropinstimulering som skjer ved infertilitetsbehandling.

Tilstanden diagnostiseres ved tilstedeværelse av to av følgende tre funn: 1) oligo-/anovulasjon, 2) hyperandrogenisme (klinisk og/eller biokjemisk), 3) polycystiske ovarier. Ufrivillig barnløshet er vanlig hos disse kvinnene. Dette skyldes i hovedsak oligo-/anovulasjon.(6) Mer enn 5% av alle kvinner i fertil alder har syndromet (7), og det er en vanlig indikasjon for IVF-behandling.

Infertilitet på grunn av forandringer eller okklusjon av egglederne, som følge av tidligere bekkenkirurgi, adheranser eller salpingitt var tidligere den dominerende årsaken til infertilitet og har fått samlebetegnelsen tubar infertilitet eller tubefaktor.

Dette er en pasientgruppe som typisk gir høy suksessrate ved IVF-behandling.

Gullstandard for diagnostikk av tubefaktor er laparoskopi. Dette ble tidligere gjort rutinemessig ved utredning av infertilitet. I dag er det ikke rutine, men utføres på indikasjon, noe som har gjort at pasientgruppen ”uforklarlig infertilitet” trolig også omfatter pasienter med for eksempel tubefaktor og endometriose, spesielt hos kvinner over 35 år.

Sammenhengen mellom endometriose og infertilitet er delvis uklar. Det finnes flere teorier om årsakssammenheng uten at noen er helt anerkjente. Både mekaniske og

kjemiske forklaringer er foreslått. Større endometrioseforandringer kan gi arr og sammenvoksninger i buken slik at infundibulum på egglederen kommer ut av posisjon i forhold til ovariet, noe som igjen kan gjøre at oocytten ikke entrer tuben, men heller går ut i bukhulen. Sammenvoksningene kan også gi skade eller blokkering av egglederne slik at oocytterne ikke når fram til ampullen for fertilisering eller til uterus for implantasjon.

Dette forklarer dog ikke hvorfor kvinner med små og få endometrioseplakk uten arr og sammenvoksninger kan bli infertile. Det er foreslått at minimal og mild endometriose er assosiert med overproduksjon av prostaglandiner, cytokiner, chemokiner og metalloproteinaser hvor påfølgende inflammasjon vil hemme ovarial-, tubar- og endometriefunksjon som igjen kan føre til defekt follikkulogenese, fertilisering og/eller implantasjon.

Det foreligger forstyrrelser knyttet til redusert eller manglende sædcelleproduksjon hos omtrent en tredjedel av parene som søker behandling for ufrivillig barnløshet.(8) Hos 39% av infertile menn kan årsaken til dårlig sædkvalitet ikke påvises eller behandles.(9) Påvisbare årsaker til mannlig sub-/infertilitet kan være obstruksjon i deler av spermietransportsystemet, ejakulatorisk dysfunksjon, samt retrograd ejakulasjon, sekveler etter infeksjoner og medikamentelle bivirkninger. 15% av mannlig infertilitet skyldes genetiske årsaker, hvor de hyppigste årsakene er Klinefelters syndrom (47,XXY) og mikrolelesjoner på Y-kromosomet.(10) Hypogonadotrop hypogonadisme (Kallmann syndrom) er en sjelden årsak til mannlig infertilitet og står for under 1% av tilfellene.(8)

Kvinnens alder er en svært viktig faktor som påvirker reproduksjonsevnen. Etter hvert som kvinnen blir eldre reduseres fruktbarheten og risikoen for spontanabort øker. Fra ca. 35 år sees en reduksjon i fertiliteten og suksessraten ved assistert befruktning synker.(11)

Utredning

Utredningen starter etter minimum et år med regelmessig samliv uten å bli gravid. Ved anamnestisk mistanke om infertilitet eller dersom kvinnen er over 35 år vil en kunne starte tidligere. Formålet med utredningen er å finne årsaken til infertiliteten, angi en rimelig prognose for å få barn og kunne velge passende behandling av paret.

Det tas opp anamnese av paret som enhet og av hver part for seg. Infertilitetens varighet (også i tidligere forhold) og eventuelle felles barn/graviditeter og graviditetsutfall etterspørres. Tidligere og nåværende sykdommer og operasjoner som kan påvirke forplantningsevnen kartlegges, så vel som medikamenter, tobakk- og alkoholforbruk og livsstil for øvrig. Dessuten tas det opp seksualanamnese. Hos kvinnen legges det vekt på menstruasjonssyklusmønsteret ettersom regelmessige sykluser med rundt 28 dagers varighet med stor sannsynlighet kan utelukke ovulasjonsforstyrrelser.

Den kliniske undersøkelsen av mannen avhenger sædprøveanalysen. Dersom denne er normal er videre utredning av mannen ikke nødvendig.(2) Ved to eller flere prøver med azoospermi eller spermiekonsentrasjon under 1 million per milliliter gjøres en utvidet utredning for å avdekke underliggende årsak. Hormonprøver med analyse av follikkelstimulerende hormon, luteiniserende hormon, testosteron og prolaktin hører med i utredningen. Kromosomanalyse og testisbiopsi kan videre bli aktuelt.

Den kliniske undersøkelsen av kvinnen består i å måle høyde og vekt. Da både for høy og for lav kroppsvekt er sett å redusere befruktningsevnen oppfordres overvektige til vektreduksjon og undervektige til å legge på seg. Behåring og androgene trekk noteres. Anatomiske avvik bemerkes ved inspeksjon og bimanuell palpasjon. Ved hjelp av transvaginal ultralyd undersøkes livmorens og endometriets utseende ift. sykluslengde, ovariene med størrelse, eventuelle cyster og antall follikler noteres og patologiske oppfyllinger i det lille bekkenet må utelukkes.

Ved regelmessige menstruasjoner tas FSH, LH og østradiol på dag tre i syklusen. Ved oligo- eller amenorre gjøres en utvidet hormonstatus med testosteron, prolaktin, c-peptid, fastende glukose, androstendion, sex hormone binding globulin, og 17-OH-progesteron i tillegg til follikkelstimulerende hormon, luteiniserende hormon og østradiol.

Dessuten kan ytterligere undersøkelser utføres på indikasjon, f.eks hysteroskopi ved mistanke om intrauterine misdannelser. Diagnostisk laparoskopi utføres ved indikasjoner som ung alder (der tidsfaktoren ikke er vesentlig), ved mistanke om endometriose, patologi i det lille bekkenet og samtidig normal sædprøve hos mannen. Ved indikasjon til ICSI er laparoskopi kun unntaksvis indisert.

Behandling

In vitro fertilisering er ikke førstelinjebehandling hos alle par med ufrivillig barnløshet. Behandlingen tilpasses den underliggende årsaken, samt individuelle hensyn og tidligere erfaring med ulike behandlingsalternativer.

Ved mistanke om ovulasjonssvikt som bakenforliggende årsak til infertiliteten og normal sædprøve går en videre til ovulasjonsstimulering med klomifencitrat. Hos mange er dette tilstrekkelig for å unnfange spontant. Ved polycystisk ovarialsyndrom er vekttap en sentral del av behandlingen og kan i seg selv føre til økt fertilitet.

Kvinner med polycystisk ovarialsyndrom kan oppnå regelmessige menstruasjoner og spontane ovulasjoner ved behandling med Metformin.(7) Metforminbehandling er også sett å forbedre utfallet av IVF-behandling hos kvinner med polycystisk ovarialsyndrom.(12)

Det finnes flere ulike protokoller og preparater for stimulering før IVF/ICSI-behandling. Hovedsaklig behandles kvinnen med en kombinasjon av FSH-injeksjoner og enten GnRH-agonist eller GnRH-antagonistpreparater i form av neseppray eller subcutan injeksjon. Follikkelvekst stimuleres med daglige injeksjoner med FSH. Gonadotropinsekresjonen, spesielt LH-sekresjonen fra hypofysen hemmes med enten agonist eller antagonist. Utviklingen av folliklene monitoreres med gjentatte transvaginale ultralydsundersøkelser. Når folliklene måler ca. 18-20 millimeter i diameter injiseres HCG subcutant for å initiere eggløsningen.

Så hentes det ut modne oocytter ved ultralydveiledet aspirasjon via skjeden. Samme dag som eggthenting skjer, leverer mannen sædprøve. Oocytene fertiliseres og dyrkes i 2-5 dager før tilbakeføring til uterus. Ved betydelig nedsatt sædkvalitet og ved noen former for azoospermi er det intracytoplasmatiske spermieinjeksjon som er standard behandling. Det betyr at en sædcelle injiseres direkte inn i en eggcelle. Ved azoospermi kan sædceller i mange tilfeller hentes fra bitestikkel eller testikkel og deretter brukes til mikroinseminasjon.

Etter eggthenting og i noen uker framover får kvinnen progesterontilskudd som lutealfasestøtte i tidlig graviditet. Etter ca. 20 dager måles HCG-nivået for å bekrefte eller avkrefte graviditet og ved positiv HCG planlegges ultralydsundersøkelse i 7.-8. svangerskapsuke for å bekrefte graviditet og vurdere om det eventuelt foreligger tvillinggraviditet.

2.2 IVF Tromsø

IVF-klinikken i Tromsø har vært sterkt delaktig i utviklingen av et regime til bruk i klinisk in vitro fertilisering som går ut på å dyrke embryoer i langtidskultur i fem døgn opp til blastocyststadiet, før tilbakeføring til livmoren. Hensikten med dette er å selekere de mest levedyktige embryoene for tilbakeføring ved å observere hvilke embryoer som utvikler seg best og ekskludere de som tidlig stagnerer eller går til grunne. Implantasjonen av et embryo etter naturlig befruktning skjer normalt på ca. dag fem til seks, og samsvar mellom endometriet og embryoutvikling kan være en annen årsak til at sjansen for graviditet ved tilbakeføring av blastocyst øker. Ved dyrkning fram til blastocyster og tilbakeføring på dag fem kan man i større grad tilbakeføre kun ett embryo enn ved tidligere stadier, noe som fører til reduksjon i antall multiple svangerskap,(7) samtidig som høy graviditetsrate beholdes og overtallige blastocyster av god kvalitet fryses ned. En Chocrane review fra 2007 viser en signifikant forskjell i fødselsrate per behandlede pasient i favør av blastocysttilbakeføring sammenliknet med den tradisjonelle metoden med korttidskultur.(13) Ved korttidskultur dyrker man de befruktete eggene til fire-/åttecellestadiet for deretter å tilbakeføre et eller to embryo på dag to eller tre. De resterende befruktete eggene med morfologisk god kvalitet fryses ned. Deretter må pasienten trolig gjenta behandlingen flere ganger med cryopreserverte embryoer, til det eventuelt lykkes å oppnå graviditet. Dette er kostbart og ressurskrevende, spesielt i Nord-Norge hvor mange av pasientene har lang reisevei til sykehuset. Frysing av overtallige embryo gjøres også ved langtidskultur, men pga. at flere embryoer ikke utvikler seg til blastocyststadiet vil det være færre embryo til frys med denne metoden enn ved korttidskultur.

Blastocystregimet anvendes i dag i stor utstrekning i USA og Asia, mens det ellers i Europa fortsatt er utstrakt bruk av korttidskultur. Tromsø IVF var pionerklinikk da blastocystregimet ble innført i 1993, og en oppnådde raskt gode resultater.(15-17)

Kvaliteten på kultursystemet hvor embryoene dyrkes er av avgjørende betydning for vellykket in vitro fertilisering. Ved Tromsø-IVF har det vært utviklet flere generasjoner medier. "Universal IVF –medium" ble utviklet og tatt i bruk i 1988. Dette mediet er egnet til dyrkning i to dager. Et blastocystregime forutsetter andre kulturmedier enn regimer med dyrkning kun til dag to. Dette kommer av at

embryoenes krav til blant annet næring, pH og osmotisk balanse endrer seg etter hvert som de utvikles. Fra 1993 ble mediet "M3" for humane blastocyster tatt i bruk i klinikken. Det tradisjonelle Universal IVF medium ble brukt fram t.o.m. dag to, og deretter ble embryoene overført til M3 mediet t.o.m. dag fem. Dette gjorde det mulig å dyrke embryoene fram til blastocyster.

På bakgrunn av ny viten om embryoers spesifikke krav har det blitt gjort flere modifiseringer av "M3" som har resultert i det sekvensielle mediesystemet "New BlastAssist" som har vært i bruk siden 2005.

2.3 Problemstilling

I denne studien skal de viktigste resultatene gjøres opp fra perioden 01.08.93-31.01.95, og resultatene skal sammenliknes med den samme statistikk fra året 2005. Disse spesifiserte periodene er valgt på bakgrunn av at nye medier ble tatt i bruk i starten av hver periode. Universal IVF i kombinasjon med M3 ble benyttet i den første perioden. I løpet av 1995 gikk man over til andre hormoner og stimuleringsregimer. I 2005 ble det nye kultursystemet, New BlastAssist bestående av mediene M1 og M2, med skift på dag to, innført og brukes fremdeles i dag.

Hovedproblemstillingen i denne oppgaven er å sammenlikne resultatene i 2005 med perioden 01.08.93-31.01.95. Har flere generasjoner forbedrede kulturmedier gitt bedre IVF-resultater?

Viktige problemstillinger i studien:

- 1) Hva har skjedd i pasientpopulasjonen fra perioden rundt 1994 til i dag, representert ved året 2005. Siden kliniske indikasjoner i dag er mer usikre, bør denne studien kun forsøksvis fokusere på pasientindikasjonene og hovedsakelig baseres på mer målbare faktorer, hvor kvinnens alder vil være den viktigste.
- 2) Vurdere pasientenes respons på hormonstimulering ved å regne ut antall egg per pasient ved eggthenting. Lavt antall her antyder at det har vært mange pasienter som er vanskelige å stimulere optimalt.

- 3) Vurdere hvor utbredt bruken av blastocystregimet har vært i de to periodene ved å regne ut andel tilbakeføringer gjort på dag fem i forhold til alle tilbakeføringer totalt.
- 4) Vurdere embryoenes utvikling ved dyrkning fram til dag fem ved å regne ut prosentvis andel embryoer som utvikles til blastocyster på dag fem.
- 5) Se på andel fertiliserte oocytter, andel uthentinger som førte til tilbakeføring, andel graviditeter og antall spontanaborter.
- 6) Etterprøve resultatene – se på fullstendig suksessrate dvs. totalt antall fødsler og levende fødselsrate i de to periodene.

3.0 MATERIALE/METODE

Dette er en retrospektiv studie fra IVF-enheten i Tromsø som inkluderer alle påbegynte behandlingssykluser i IVF-programmet ved Universitetssykehuset i Nord Norge i to definerte perioder. Første periode strekker seg over 18 måneder fra 01.08.93 til 31.01.95, mens andre periode omfatter året 2005, fra 01.01.05 til 31.12.05. Periodene vil videre omtales som henholdsvis første og andre periode.

Det er kun ren in vitro fertilisering som er inkludert. Intracytoplasmatisk spermieinjeksjon (ICSI) eller annen form for assistert befruktning er ikke vurdert i studien. Dette på grunn av at ICSI ikke ble innført som behandlingsmetode i Tromsø før i 1996, altså etter første periode. En del av pasientene startet flere behandlingssykluser innenfor samme periode og det er derfor tatt hensyn til totalt antall påbegynte sykluser, ikke antall pasienter.

Pasientgruppene er svært heterogene i sammensetning i forhold til indikasjon og alder, variabler som sterkt vil påvirke behandlingsutfallet. Det er dog ikke gjort øvrig seleksjon av pasienter utover tidsperiode og behandlingsform.

Materialet er hentet fra to ulike programmer hvor opplysninger om pasientene og behandlingen er registrert fortløpende. Materialet fra første periode er hentet fra programmet "Paradox" hvor pasientopplysninger, stimuleringsregimer, indikasjon for IVF, dato for uthenting og tilbakeføring av henholdsvis oocytter og embryoer, antall uthentede oocytter, samt overvåking av embryoenes utvikling in vitro er registrert. Materialet fra 2005 er hentet fra registreringsprogrammet "In Vitro" hvor pasientopplysninger, IVF-indikasjon, embryoutvikling og dato for uthenting og

tilbakeføring er registrert. De relevante variablene ble summert og resultatene i de to ulike periodene ble sammenlignet med hverandre.

Det er hovedsakelig søkemotorene PubMed og Cochrane som er benyttet i litteratursøk. Direkte søk i Tidsskriftet for den norske legeforening og New England Journal of Medicine er også foretatt. ”Textbook of Assisted Reproductive Techniques” og artikler publisert av avdelingens medarbeidere er brukt som bakgrunnsmateriale.

4.0 RESULTATER

4.1 Behandlingssykluser og egguthenting

Det er i registreringsprogrammet Paradox angitt 360 påbegynte behandlingssykluser i tidsrommet 01.08.93-31.01.95. Dette omfatter i utgangspunktet alle pasientene som begynte med hormonstimulering før egguthenting. 356 av disse er registrert med uthenting av minimum en oocyt. I andre periode er det registrert 232 påbegynte sykluser, og herav gikk 202, altså 87%, til egguthenting.

4.2 Antall oocytter hentet ut og befruktet

I første periode ble det totalt hentet ut 2939 oocytter, fordelt på de 356 pasientene som fikk gjennomført egguthenting, dette gir et gjennomsnitt på 8,3 oocytter per pasient. I andre periode ble 1705 oocytter hentet ut, fordelt på 202 egguthenting. Dette gir et gjennomsnitt på 8,4 oocytter per pasient.

1649 av 2939 uthentede oocytter i første periode ble vellykket befruktet, dette gir en befruktningsrate på 56%. I andre periode lyktes det å befrukte 1103 av 1705 uthentede oocytter, altså 65%.

4.3 Blastocyster

307 av 356 sykluser med egguthenting førte til tilbakeføring av embryo i første periode. Herunder fikk 43 stk. tilbakeført ett enkelt embryo, 263 fikk to og en fikk tilbakeført tre embryo. Til sammen ble totalt 572 embryoer tilbakeført.

Det vil si at 86% av de som fikk hentet ut oocytter fikk også tilbakeført et eller flere embryo. 14% av syklusene mislyktes i å dyrke fram levedyktige embryoer for tilbakeføring.

I 2005 ble det i 178 av de 202 syklusene med eggthenting tilbakeført embryoer, 12% av syklusene mislyktes altså i å dyrke fram levedyktige embryoer for tilbakeføring. 52 stykker fikk tilbakeført ett embryo, mens 126 fikk to embryo tilbakeført, det ble ikke tilbakeført mer enn to embryo i samme syklus i løpet av denne perioden. Totalt 304 embryoer ble tilbakeført.

I første periode ble 153 av totalt 307 tilbakeføringer gjort på dag fem. Det vil si at i halvparten av syklusene gjennomgikk embryoene langtidsdyrkning. Totalt ble 283 embryoer satt tilbake i livmoren på dag fem. 106 av disse, altså 37,5%, oppnådde blastocyststadiet på dag fem. 137 (48,4%) av embryoene utviklet seg fram til morula i løpet av fem dagers dyrkning. De resterende oppnådde kun utvikling til 16 celler eller tidligere stadier.

I andre periode ble 64 av totalt 178 tilbakeføringer gjort på dag fem, altså en andel på 36% ble dyrket i langtidskultur. 104 embryoer ble totalt satt tilbake på femte dag. Av disse hadde 82 embryoer utviklet seg til blastocyster ila. fem dagers dyrkning, det utgjør en blastosystrate på 78,8%. 18 embryoer, 17,3%, utviklet seg til morula, mens de resterende oppnådde 16 celler eller stagnerte på tidligere stadier.

4.4 Graviditeter

Graviditet påvises med HCG-måling ca. tre uker etter tilbakeføring av embryo til livmoren og bekreftes med ultralydsundersøkelse etter ca. 7-8 uker. Påfølgende beregninger inkluderer alle med positiv HCG, også de som senere får en negativ ultralyd og dermed også havner i gruppen med tidlige spontanaborter.

I første periode er det registrert 146 kliniske graviditeter, dette utgjør en graviditetsrate på 40,6% av alle påbegynte sykluser og 48% av alle som fikk utført embryotransfer. I 2005 er det til sammenlikning registrert 88 graviditeter, noe som gir en graviditetsrate på 37,9% og graviditet/embryotransferrate på 49,4%. Det er her ikke tatt hensyn til antall foster per pasient, kun om graviditet er påvist eller ei.

4.5 Spontanaborter

Av de registrerte graviditetene i første periode endte 16 med spontanabort, noe som gir en abortrate på 11%. Fire av abortene skjedde før sjette svangerskapsuke, altså før graviditeten var ultralydsbekreftet. Syv av graviditetene endte med abort i mellom sjette og tolvte uke, mens en abort forekom mellom 12. og 16. uke og tre aborter etter passerte 16. svangerskapsuke.

I 2005 er det registrert totalt 17 spontanaborter, fordelt på to aborter før sjette uke, 14 mellom sjette og 12. uke og én mellom 12. og 16. uke. Dette gir en abortrate på 19,3%.

4.6 Fødsler

I første periode ble det født 177 levende barn, hvorav et sett trillinger, 45 tvillingpar og 84 enebarn. To barn var dødfødte, herav inngikk den ene i som fjerde barn og den andre som del av et tvillingpar. Det var altså 130 fødsler totalt, noe som gir en total fødselsrate på 36% av alle påbegynte sykluser og 42% av alle tilbakeføringer. I andre periode ble det registrert til sammen 83 levendefødte barn. Et av barna i et tvillingpar var dødfødt. 13 var tvillingpar og 57 enebarn, totalt 70 fødsler. Dette gir en fødselsandel i forhold til totalt antall påbegynte sykluser på 30,2% og av alle tilbakeføringer på 39%.

Av totalt antall tilbakeførte embryoer i første (572stk.) og andre (304 stk.) periode førte hhv. 31% og 27% til levende fødte barn.

4.7 Alder

Beregning av alderen til kvinnene som startet IVF-behandling ved Tromsø IVF i perioden rundt 1994 og i 2005 viser at den gjennomsnittlige alderen i de respektive periodene var henholdsvis 33 og 34 år, og median alder er beregnet til 34 og 35 år. I første periode var aldersspredningen fra 24 til 43 år, mens i andre periode var yngste pasient kun 21 år og eldste 42 år gammel.

4.8 Indikasjoner

Hos enkelte av pasientene er det registrert flere diagnoser som årsak til infertilitet. Beregningene gjør derfor at prosentandelene ikke går nøyaktig opp i 100%, men vil overskride noe.

I første periode var den dominerende diagnosen tubar infertilitet, dvs. infertilitet pga. skadde eggledere av ulike årsaker. I 313 av 360 tilfeller var tubefaktor registret som årsak til infertiliteten. I andre periode derimot var kun 62 av 232 begrunnet med tubar infertilitet. Dette gir en prosentandel på henholdsvis 87% mot 27%.

Andelen pasienter med uforklarlig infertilitet har økt betydelig fra første til andre periode. I perioden rundt 1994 ble det i 39 av 360 sykluser ikke funnet forklaring bak infertiliteten, mens i 2005 utgjorde denne gruppen 95 av 232 tilfeller, altså en økning fra 10,8 til 40,9%.

Ovulasjonsforstyrrelse som diagnose har holdt seg rimelig stabil over de to periodene. I første periode var dette registrert som indikasjon i 4,2% av tilfellene og i 2005 i 5,2%.

Endometriose har økt noe fra første til andre periode. I første periode var 11 av 360 registrert med diagnosen endometriose, mens i 2005 hadde 21 av 232 denne diagnosen registrert som årsak til infertilitet.

Mannlig infertilitet, altså nedsatt kvalitet eller antall spermier, er angitt som indikasjon for IVF-behandling i 3,3% i første og 6,0% i andre periode. Det er også en andel av de inkluderte pasientene som ikke har fått registrert en diagnose i registreringsprogrammene og noen som har andre diagnoser enn de nevnt over. Se for øvrig tabell.

5.0 DISKUSJON

5.1 Fullstendig suksessrate

Resultatene ved IVF- enheten i Tromsø er generelt svært gode med en fødselsrate av alle tilbakeføringer på 42% i første periode og 39% i andre periode. Dette sammenliknet med gjennomsnittlig 16,2% i Europa, 17,2% i Skandinavia og 28,3% i USA.(18) De høyere tallene i USA reflekterer nok en mye større anvendelse av langtidskulturer, som også er tilfelle i Tromsø.

Ut fra resultatene ser man at andelen påviste graviditeter av alle som fikk tilbakeført embryo har økt marginalt fra første til andre periode. Spontanabortraten har derimot økt med 7,7%. Den fullstendige suksessraten, målt i antall fødsler av alle påbegynte sykluser har sunket fra 36 til 30,2%, mens andel levendefødte barn av totalt antall embryoer som ble tilbakeført, samt andel fødsler av alle kvinnene som fikk tilbakeføring av ett eller flere embryo, begge var 3% lavere i andre enn i første periode. Disse endepunktene viser at behandlingsresultatene er omtrent like bra i andre som i første periode. Den videre diskusjonen vil forsøke å belyse årsakene til dette.

5.2 Hormonstimulering

I første periode ble humant menopausalt gonadotropin bestående av både folikkelstimulerende hormon (FSH) og luteiniserende hormon (LH) derivert fra urin til postmenopausale kvinner brukt som hormonell stimulering før egguthenting. I løpet av 1995 gikk man over til rekombinant framstilt FSH som eneste stimuleringshormon, da man ville bort fra de hormonelt effektive, men biologisk variable humane preparatene.

I første periode er det noe usikre data på antall påbegynte sykluser. Det er en oppsiktsvekkende høy andel (99%) av syklusene som har ført til egguthenting og det kan diskuteres om dette er riktig eller kan forklares med svakhet i registreringen, hvor ikke alle sykluser som ble avbrutt før egguthenting er registrert. Dette kan være en feilkilde i beregningene. Går en likevel ut fra at dette tallet stemmer, førte en større andel av de påbegynte syklusene i første periode til egguthenting sammenliknet med

en prosentandel på 87% i andre periode. Flere studier og en Cochrane review fra 2003 konkluderer med at det ikke er signifikant forskjell i stimulerings effekt mellom de to typene hormonpreparater,(19,20) noe sterkt peker i retning at det er forhold hos pasientene i andre periode som gjør at det er blitt vanskeligere å stimulere ovariene optimalt. Gjennomsnittlig antall egg uthentet per pasient har ikke endret mellom periodene.

5.3 Fertiliseringsrate og embryoutvikling

En ser en økning på 9% i andel befruktete egg i andre periode sammenliknet med første. Det mislyktes å dyrke fram levedyktige embryo for tilbakeføring i 14% av alle egguthentingene ved bruk av de gamle mediene, mens i andre periode mislyktes 12% av syklusene.

Embryoene hadde en betydelig hurtigere modning i det nye sekvensielle mediet "New BlastAssist" i andre periode, enn i det gamle kulturmediet "Universal IVF" kombinert med M3. En vesentlig større andel av embryoene med tilbakeføring på dag fem nådde blastocyststadiet i andre periode sammenliknet med tilsvarende andel i første periode. Dette forklares med at man på grunn av ny kunnskap har kunnet tilpasse de nyere mediene mer til embryoenes spesifikke krav. I dag er mediene betydelig mer komplekse og består av flere ulike næringsstoffer enn tidligere, mens konsentrasjonene av næringsstoffene endrer seg i løpet av dyrkingen for å imøtekomme embryoenes ernæringsbehov etter hvert som de modnes. Ved bruk av de nye mediene overføres embryoene på dag to fra et medium med lav konsentrasjonen av glukose og få aminosyrer til et medium med høyere glukosekonsentrasjon og et større antall aminosyrer. Dette fordi stimulering av glykolysen forstyrrer de to første celledelingene og behovet for glukose og andre næringsstoffer endrer seg etter noen dager.

Den økte befruktningsraten, utviklingshastigheten og høye blastocystandelen tyder på at forholdene for embryoenes utvikling og blastocystkvaliteten er betydelig bedret ved bruk av de nye mediene, mens det kvantitative utbyttet ikke har endret seg nevneverdig. Det kan tenkes at det på grunn av de bedre forholdene for embryoene i kulturmediet har gjort at ellers ikke-levedyktige embryo overlever in vitro, men viser seg å ikke være levedyktige in vivo. Dermed resulterer tilbakeføringen i manglende

implantasjon eller spontanabort, noe som kan reflektere den økte abortraten i andre periode.

5.4 Tilbakeføringer og bruk av blastocystregime

Andelen tilbakeføringer som ble gjort på dag fem av totalt antall tilbakeføringer i andre periode er redusert med 15%, sammenliknet med første periode. Dette kan komme av økonomiske hensyn, da dyrkning fram til dag fem er mer ressurskrevende og kostbart enn kortere dyrkning, da langtidskultur krever lengre overvåking/oppfølging og dermed økt bemanning på laboratoriet. Det kan dessuten være vanskelig å tilrettelegge egguthenting slik at tilbakeføringen ikke faller på en helgedag. Dette gjør at man på grunn av logistiske utfordringer i mange tilfeller ikke dyrker helt til blastocyststadiet, men velger å tilbakeføre embryoet en dag eller to tidligere, da nytteverdien ikke vil veie opp for kostnadene ved å måtte utføre prosedyrer på fridager. En Cochrane systemisk review fra 2007 (13) viser en signifikant forskjell i fødselsrate per pasient i favør av blastocysttilbakeføring sammenliknet med tilbakeføring av embryo i tidligere stadier. Det at andelen blastocysttilbakeføringer er redusert i andre periode kan i så måte ha hatt direkte innvirkning på at behandlingsresultatene ikke har blitt bedre.

5.5 Tilbakeføring av ett eller flere embryo

I første periode ble det rutinemessig tilbakeført to embryo, dersom to eller flere embryo var egnet for tilbakeføring. I oktober 2005 gikk man over til å kun overføre ett embryo per tilbakeføring ved første behandling, for å redusere andelen flerlingsvangerskap. En studie publisert av A. Thurin og J. Hausken et al. konkluderer med at tilbakeføring av et enkelt embryo etterfulgt av (dersom unnfangelse ikke lykkes ved første forsøk) innsetting av ett frosset og tint embryo i stedet for tilbakeføring av to embryo i samme prosedyre, resulterer i en markert reduksjon i flerlingsvangerskap, uten vesentlig reduksjon i graviditets- og fødselsrate.(21) Endringene av rutineene i forhold til antallet tilbakeførte embryo ansees ikke å ha påvirket den fullstendige suksessraten.

5.6 Endringer i pasientpopulasjonen

Det har skjedd en tydelig endring i pasientpopulasjonen fra første til andre periode, først og fremst i pasientindikasjonene, men også i økt gjennomsnittsalder.

Median og gjennomsnittlig alder hos kvinnene har økt med ett år fra første til andre periode. Det skjer en naturlig nedgang i fertiliteten hos alle kvinner med økende alder. En studie publisert av BJ. Van Voorhis har vist at etter fylte 34 år reduseres levendefødselsrate med 2-6% for hvert års økning i kronologisk alder.(11) Kvinnens alder er en av de viktigste faktorene som påvirker sjansen for unnfangelse, både spontant og ved behandling.(22) Dette kommer av en reduksjon i oocyttereserven, samt naturlig aldring av eggene og dermed forringet kvalitet. Altså er både oocyttkvalitet og kvantitet, samt senere embryokvalitet, relatert til kvinnens alder, og en aldersøkning på gjennomsnittlig ett år i pasientpopulasjonen vil påvirke behandlingsutfallet i negativ retning.

Det er tydelig diskrepans i pasientindikasjoner for behandling mellom periodene. Indikasjonene for behandling har skiftet fra å hovedsaklig være tubefaktor i første periode til å domineres av ”uforklarlig infertilitet” i periode to. Som tidligere nevnt omfatter gruppen ”uforklarlig infertilitet” trolig flere diagnoser nå enn tidligere, da diagnostisk laparoskopi ikke lengre utføres rutinemessig. Dette gjør det derfor vanskelig å konkludere angående indikasjonenes innflytelse på behandlingsresultatene. I hvilken grad den underliggende patologien i seg selv kan påvirke sjansene for vellykket behandling har vært nøye studert. Tidlige rapporter indikerte at enkelte årsaker til infertilitet var assosiert med dårligere prognoser for vellykket behandlingsresultat enn andre. Senere har store publiserte studier av effekten av årsaken til kvinnelig infertilitet ikke vist signifikant effekt på utfallet av IVF.(23) I stedet er graviditetssjansene avgjort av kvinnens alder, infertilitetens varighet og tidligere graviditeter.(23) De senere år har innvirkningen av enkelte underliggende årsaker til infertilitet på IVF-utfall blitt klarere.

Ikke-randomiserte studier viser signifikant lavere fertilisering, implantasjon og graviditetsrate hos pasienter med endometriose sammenliknet med tubefaktor.(24) Innvirkningen tubefaktor har på utfallet av IVF er kontroversielt. Generelt er tubefaktor forbundet med relativt gode prognoser.(25) På bakgrunn av den økte

alderen, de endrede indikasjonene for IVF og den reduserte andelen tubefaktor er det tydelig at pasientgruppen er blitt vanskeligere å behandle.

Andelen mannlig infertilitet i denne populasjonen er vesentlig lavere enn i en uselektert populasjon av infertile par, hvor man vil forvente at ca. 30% av parene er infertile som følge av mannlig infertilitet alene og opptil 50% hvor mannlig faktor er medvirkende årsak. Dette kommer av at denne studien kun har inkludert de pasientene som gjennomgikk ren IVF-behandling. Parene med mannlig faktor som bakgrunn for infertiliteten hadde i første periode ikke noe godt behandlingstilbud. Noen få med mannlig infertilitet, i denne perioden 12 par, ble forsøkt behandlet med IVF. Intracytoplasmatisk spermieinjeksjon var ikke tilbudt som behandlingalternativ ved Tromsø-IVF før i 1996. De parene med mannlig infertilitet i andre periode har hovedsaklig gjennomgått ICSI-behandling og er dermed ikke medberegnet her, mens en liten del av denne gruppen forsøkes behandlet med både IVF og ICSI. Dette gjør at behandlingstilbudet i dag totalt sett er betydelig bedret og en stor gruppe av infertile som tidligere ikke ville hatt muligheten kan nå behandles.

6.0 KONKLUSJON

IVF-klinikken i Tromsø har generelt svært gode resultater sammenliknet med gjennomsnittet i verden. Til tross for at pasientene er blitt eldre og vanskeligere å behandle har resultatene ikke blitt dårligere. Dette henger uten tvil sammen med bedre in vitro-teknologi, hvor særlig kulturmediene spiller en stor rolle. Forholdene for embryoene in vitro er betydelig bedret, og med de nye mediene sees en hurtigere embryovekst og bedre embryokvalitet. De endelige resultatene av IVF-behandlingen ved IVF-klinikken i Tromsø målt i andel graviditeter og antall levendefødte barn av alle tilbakeføringer var omtrent de samme i år 2005 som i perioden 01.08.93-31.01.95. Den økte abortraten i andre periode er trolig en gjenspeiling av at forbedrede kulturmedier har gjort at ellers ikke-levedyktige embryo overlever in vitro, men viser seg å ikke være levedyktige in vivo.

Isolert sett sees ingen bedring i fødselsraten, men her er det viktig å understreke at det den senere tiden har kommet et nytt behandlingalternativ, intracytoplasmatisk spermieinjeksjon, til en stor andel av infertile par som tidligere ikke hadde noe godt behandlingstilbud. Legges antall fødsler etter IVF og ICSI sammen vil man få et vesentlig større antall enn før.

7.0 TAKK

Takk til professor Kjell Bertheussen for kyndig veiledning under utarbeidingen av oppgaven, og takk til dr. Martha A. Hentemann ved IVF-enheten for grundig gjennomlesning og konstruktiv tilbakemelding av arbeidet.

8.0 TABELLER

8.1 Tabell 1. Oversiktstabell begge perioder.

	Periode 1 01.08.93- 30.01.95		Periode 2 01.01.05- 31.12.05	
Antall startede behandlingssykluser	360	100,0 %	232	100,0 %
Antall oocytthentinger	356	98,9 %	202	87,1 %
Antall oocytter uthentet	2939	100,0 %	1705	100,0 %
Antall fertiliserte oocytter	1649	56,1 %	1103	64,7 %
Antall embryotilbakeføringer (ET)	307		178	
andel av alle behandlingssykluser		85,3 %		76,7 %
andel av oocytthentinger		86,2 %		88,1 %
Singel ET	43	14,0 %	52	29,2 %
Dobbel ET	263	85,7 %	126	70,8 %
Trippel ET	1	0,3 %	0	0 %
Totalt antall tilbakesatte embryo	572		304	
Andel ET dag 5 av alle ET	153	49,8 %	64	36,0 %
Andel blastocyster dag 5		37,5 %		78,8 %
Antall kliniske graviditeter	146		88	
andel av alle behandlingssykluser		40,6 %		37,9 %
andel graviditeter av alle ET		47,6 %		49,4 %
Antall spontanaborter	16	11,0 %	17	19,3 %
Antall fødsler	130		70	
andel av alle behandlingssykluser		36,1 %		30,2 %
andel fødsler av alle ET		42,3 %		39,3 %
Antall levende fødte barn	177		83	
singel	84		56	
dobbel	45		14	
trippel	1			
andel levende fødte barn av totalt antall tilbakesatte embryo		30,9 %		27,3 %
Alder	gjennomsnitt	33		34
	median	34		35
	spredning	24-43		21-42
Indikasjon				
Tubar	313	86,9 %	62	26,7 %
Ovarial	15	4,2 %	13	5,6 %
Endometriose	11	3,1 %	15	6,5 %
Mannlig faktor	12	3,3 %	14	6,0 %
Uforklarlig	39	10,8 %	95	40,9 %
Annet		0,0 %	17	7,3 %
Uten angitt årsak	4	1,1 %	13	5,6 %

8.2 Tabell 2.

Embryoutvikling ved tilbakeføring dag fem, første periode.

Stadium	Dag 3	%-andel	Dag 4	%-andel	Dag 5	%-andel
Tidli. Stadium			14	4,9 %	9	3,2 %
4 celler	32	11,3 %				
5 celler	11	3,9 %				
6 celler	35	12,4 %				
7 celler	9	3,2 %				
8 celler	146	51,6 %	20	7,1 %	2	0,7 %
10 celler	40	14,1 %	35	12,4 %	2	0,7 %
12 celler	6		26	9,2 %	9	3,2 %
14 celler	0		35	12,4 %	4	1,4 %
16 celler	1	0,4 %	68	24,0 %	11	3,9 %
18 celler			0	0,0 %	0	0,0 %
Morula			82	29,0 %	137	48,4 %
Blastocyst			2	0,7 %	106	37,5 %
Ukjent/ikke reg.	3	1,1 %	1	0,3 %	3	1,1 %
SUM	283	100,0 %	283	100,0 %	283	100,0 %

8.3 Tabell 3.

Embryoutvikling ved tilbakeføring dag fem, andre periode.

Stadium	Dag 5	%-andel
10-12 celler	2	1,9 %
16 celler	2	1,9 %
Morula	18	17,3 %
Blastocyst	82	78,8 %
SUM	104	100 %

9.0 REFERANSER

- 1) Jose-Miller AB, Boyden JW. Infertility. *Am Fam Physician* 2007;75: 849-56.
- 2) Düring V, Hentemann MA. Infertilitet. Norsk gynekologisk forening. *Veileder i generell gynekologi* 2009.
- 3) Edwards RG. Introduction: the beginnings of human in vitro fertilization. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques* 2004: 1-15.
- 4) Fauser BCJM, Macklon NS. Medical approaches to ovarian stimulation for infertility. In: Strauss J III, ed. *Reproductive Endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders, 2004: in press.
- 5) Isaksson R, Tiitinen A. Present concept of unexplained infertility. *Gynecol Endocrinol* 2004; 18: 278-290.
- 6) Sagle M, Bishop K, Ridley N. Recurrent early miscarriage and polycystic ovaries. *Br Med J* 1988; 297: 1027-8.
- 7) Ekerhovd E. Polycystisk ovariesyndrom. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2005; 125:2351-4.
- 8) Oldereid NB, Tanbo T. Induksjon av spermatogenese ved hypogonadotrop hypogonadisme. *Tidsskr Nor Legeforen* 2008; 128:327-9.
- 9) Attia AM, Al-Inany HG. Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 4.
- 10) Ørstavik HK. Genetiske årsaker til mannlig infertilitet. *Tidsskrift for Den norske legeforening*. 2008; 128: 324-6.
- 11) Van Voorhis BJ. In Vitro Fertilization. *New England Journal of Medicine* 2007; 356:379-386.

- 12) Stadtmauer L, Toma S, Riehl R, Talbert L. Metformin treatment for patients with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilization improves outcomes and is associated with modulation of the insulin-like growth factors. *Fertil Steril* 2001; 75:505.
- 13) Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Gynecol Obstet Invest.* 2002;53(4):220-3. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Oct 17;(4).
- 14) Hentemann M, Bertheussen K. New media for culture to blastocyst. *Fertility and Sterility* 2009; 3: 878:883.
- 15) 1994, Nordiske IVF-konferanse Røros, Norge.
- 16) 1995, Nordisk IVF-kongress Ebeltoft, Danmark.
- 17) Bertheussen K, Forsdahl F, Maltau JM. In vitro fertilization- new media for embryo culture to the blastocyst stage. *Proceedings of the 10th World Congress of In Vitro Fertilization & Assisted Reproduction, Vancouver, Canada.* 199-204.
- 18) Malizia BA, Penzias AS. A retrospective data analysis using published data from CDC (Center for Disease Control), USA, and ESHRE, Europe. Harvard Medical School, USA. *ASRM 63rd Annual Meeting* , 2007, Washington DC.
- 19) Ismail AF, Hesham AI, Salah Z, Khaled M, Fouad N, Ashraf N, Hatem S, Hamdi B. A prospective comparative study on IVF outcomes with either purified FSH or human menopausal gonadotrophin in downregulated normogonadotrophic women. *Gynecol Obstet Invest.* 2002;53(4):220-3.
- 20) Van Wely M, Westergaard LG, Bossuyt PM, Van der Veen F Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle stimulation hormone for

ovarian stimulation in assisted reproductive cycles. Cochrane Database Syst Rev. 2003;(1):CD003973.

- 21) Thurin A, Hausken J, Hillensjo T, et al. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. N Engl J Med 2004;351:2392-2402.
- 22) Clinical Review. ABC of subfertility, making a diagnosis. BMJ 2003; 327.
- 23) Templeton AA, Morris JK, Parslow W. Factors that affect the outcome of in vitro fertilization treatment. Lancet 1996; 348:1402-06.
- 24) Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization and embryo transfer success rates, Fertil Steril 2002; 77:1148-55.
- 25) Barmat LI, Rauch E, Spandorfer S, et al. The effect of hydrosalpinges on IVF-ET outcome. J Assist Reprod Genet 1999; 16: 350-4.