

PROFESJONSSTUDIET I MEDISIN VED UNIVERSITETET I  
TROMSØ – NORGES ARKTISKE UNIVERSITET



---

**UiT** / NORGES ARKTISKE  
UNIVERSITET

**Sammenligning av resultat etter transfer av embryoer som ble  
frosset på dag 5 og dag 6 ved IVF/ICSI behandling.**

Av: Sara Pettersen

MK-11

Veileder: Martha Hentemann

Overlege IVF klinikken UNN

2016

## **Sammendrag:**

### **Formål**

Formålet med denne oppgaven er å se på transfer av embryo som er frosset dag 5 og dag 6, og sammenligne de respektive dagene for å se om kvinnen har blitt gravid og om hun hadde et fullbåret svangerskap. Det å fryse overtallige embryo er blitt en rutine innenfor kunstig befruktning. Det er få store studier som er gjort der det er sett på samme problemstilling som i denne oppgaven, og dette er grunnen til at IVF-klinikken ønsker å se på deres tall. På bakgrunn av observasjonene som gjøres kan man vurdere om det er noen forskjell med tanke på kvinnens mulighet til å bli gravid etter nedfrysing dag 5 sammenlignet dag 6, og om man skal fortsette å fryse på dag 6.

### **Materiale og metode**

Oppgaven er en liten retrospektiv studie basert på informasjon som er hentet ut fra dataprogrammet «In Vitro» ved IVF klinikken på UNN. Inkludert i studien er kvinner som har fått nedfrost overtallige embryo dag 5 eller dag 6 i perioden januar 2010 til januar 2015, og i etterkant fått overføring av blastocyst(-er) i tidsrommet januar 2010 til januar 2016. Alle embryo var frosset etter "slow freeze" metoden.

### **Resultat og diskusjon**

Av de 449 tinte blastocystene som ble overført var 392 blastocyster fryst dag 5 og 57 blastocyster fryst dag 6. Resultatet viste at blastocystene fryst dag 5 gav 13,3% (52/392) fullbårne svangerskap, sammenlignet med 14,0% (8/57) hos blastocystene som ble fryst dag 6. Videre viser tallene at antall kliniske svangerskap er 16,6% for dag 5 gruppen og 14,0% for dag 6 gruppen, og at implantasjonsfrekvensen er 19,9% for dag 5 gruppen og 14,0% for dag 6 gruppen. Ved bruk av Fischers eksakte test er det ikke signifikant forskjell mellom implantasjonsfrekvens, antall fødte barn, antall kliniske graviditeter eller antall aborter etter transfer av blastocyster (blc) som ble frosset på dag 5 eller 6 ( $p < 0,01$ ).

### **Konklusjon**

Resultatene fra denne lille studien ved IVF-klinikken ved UNN viser ikke signifikant forskjell for resultatene etter transfer av blc. som er frosset på dag 5 i forhold til dag 6. Det er hensiktsmessig å fryse blastocyster på dag 6, selv om de er litt forsinket utviklet på dag 5. Gjennomgang av litteraturen viser samme resultat i de få, store studiene som er gjennomført.

## Innholdsfortegnelse

<b>SAMMENDRAG</b>	<b>2</b>
<b>1.0 BAKGRUNN</b>	<b>4</b>
1.1 IVF-behandling	4
1.2 Embryoutvikling og morfologi	6
1.3 Nedfrysing og opptining av embryoer	6
1.4 To ulike metoder for nedfrysing	8
1.5 Valg av dag for nedfrysing	9
1.6 Embryo transfer	10
<b>2.0 MATERIALE OG METODE</b>	<b>11</b>
2.1 Statistikk	12
2.2 Arbeidsprosessen	12
<b>3.0 RESULTATER</b>	<b>13</b>
<b>4.0 DISKUSJON</b>	<b>16</b>
4.1 Studier som viser at det forskjell mellom nedfrysing dag 5 og 6	18
4.2 Studier som viser at det ikke er signifikant forskjell mellom nedfrysing dag 5 og 6	18
4.3 Konklusjon	20
<b>REFERANSER</b>	<b>21</b>
<b>VEDLEGG: statistikk, Fischers eksakte test</b>	<b>23</b>

## **1.0 BAKGRUNN**

### **1.1 IVF-behandling**

Assistert befruktning ble startet i 1978, da det første ”prøverørsbarnet” kom til verden i Storbritannia. Det første barnet som kom til ved IVF-behandling i Norge ble født i 1984 (1). I dag er assistert befruktning et behandlingstilbud til par som ikke selv klarer å bli gravid på den naturlige måten. Assistert befruktning omfatter inseminering av spermier (partnerinseminasjon (AIH) eller donorinseminasjon (AID), In Vitro Fertilisering (IVF), Intracytoplasmatisk spermieinjeksjon (ICSI) og Frozen embryo replacement (FER) med frysing og tilbakesetting av tinte embryo (2). Dette er blitt et svært viktig tilbud og flere enn 5 millioner barn har hittil kommet til verden ved hjelp av dette. Den mest brukte formen er IVF-behandling, og indikasjoner for å benytte dette kan være mange. Her er noen eksempler på de viktigste årsakene til infertilitet:

- Kvinner:

- |                |   |
|----------------|---|
| ○ tubefaktorer | ○ hormonelle årsaker                    |
| ○ infeksjoner  | ○ anatomiske abnormaliteter             |
| ○ endometriose | ○ genetiske- eller nedarvede sykdommer. |
| ○ PCOS         |   |

- Menn:

- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| ○ infeksjoner                      | ○ genetiske- eller nedarvede sykdommer |
| ○ toksiske legemidler              |  |
| ○ vaskulære årsaker som varicocele | ○ redusert sædkvalitet                 |
|                                    | ○ retrograd ejakulasjon                |

Mennesker i fertil alder som ikke ha fått barn og som rammes av kreft, kan også benytte seg av moderne reproduksjonsteknikk. Kreftbehandlingen kan være skadelig for reproduksjonsorganene, og i forkant av behandlingsoppstart kan pasientene få tilbud om å fryse ned sæd, eggceller eller ovarievev. IVF-behandling vil gi tilbud til slike pasientgrupper når de en dag ønsker seg barn. I enkelte tilfeller er det ønskelig at det gjøres diagnostikk på embryoet før implantasjon, såkalt preimplantasjonsdiagnostikk. Her gjøres det genetisk testing, for eksempel vist det er stor risiko for alvorlige arvelige sykdommer. IVF-behandling er nødvendig sammen med slik diagnostikk. Metoden for assistert befruktning har lagt grunnlag for stamcelleforskning på embryonale stamceller. I Norge kan personer som får assistert befruktning få tilbud om å donere overskuddsembryo til forskning i stedet for at de kastes når de ikke kan lagres lengre (3).

Hovedprinsippet for IVF-/ICSI-behandling er at egget fertiliseres utenfor livmoren før det føres tilbake til kvinnens livmor som et embryo. Metoden har blitt mer og mer utviklet i løpet av de siste ti-årene. Kvinnen blir hormonelt behandlet etter nøyaktige stimulasjonsprotokoller for å utvikle mer enn bare en follikkel. Eggløsning blir induisert og egguthenting planlagt. Ved hjelp av ultralydveiledet follikkelaspirasjon hentes eggene ut fra ovariene.

Ved IVF inkuberes eggene så med vasket sperm fra partneren i et vekstmedium. Spermien vil fertilisere oocytten ved at den tar seg gjennom cumuluscellene som omgir egget, de binder og penetrerer Zona Pellucida (ZP) ved hjelp av spesifikke reseptorer. Spermier som er bundet til ZP gjennomgår akrosomreaksjon, som består i at spermens plasmamembran og ytre akrosom-membran smelter sammen og enzymer i akrosomet frisettes. Disse enzymene bryter ned og penetrerer ZP. Tilslutt fusjonerer spermene med oolemma, eggets plasmamembran, og tar seg inn i cytoplasma (2). Det fertiliserte embryoet ligger i vekstmediet noen dager før det overføres transcervikalt til livmoren. Er det flere gode embryo som har utviklet seg vil de overtallige embryoene fryses, og kan benyttes senere.

ICSI brukes for eksempel ved nedsatt sædkvalitet (4), dvs. ved nedsatt antall sædceller, nedsatt konsentrasjon av sædceller eller ved dårlig motilitet. Her trenger spermien hjelp til å komme gjennom Zona Pellucida og oolemma. En enkel sædcelle blir injisert direkte inn i eggcellen vha. mikropipette før det legges i vekstmediet. Metoden er mer invasiv enn vanlig IVF, og i tillegg mer tidkrevende for klinikken.

Videre forløp, dyrkning, transfer av embryo og frysing av overtallige embryo, er lik for IVF og ICSI.

Et behandlingsforsøk ved IVF/ICSI ser slik ut:

- Dag 0: sædanalyse og egguthenting (ovum pick up = OPU), og inseminering ved IVF/ICSI.
- Dag 1: bedømmelse av befruktningen.
- Dag 2-5: bedømmelse av befruktningen, vurdering av embryokvalitet og utvelgelse av embryo til tilbakesetting i livmor og embryo transfer.
- Dag 2-6: eventuell kryopreservering av embryo kan gjøres.

Vekstmediene er tilpasset de forskjellige utviklingsstadier embryoet er i.

## **1.2 Embryoutvikling og morfologi**

Når en oocyt blir fertilisert dannes det en zygote, en diploid celle. Ved riktig fertilisering vil det etter 18-27 timer være to celler. Allerede i dette stadiet finnes det studier som viser at en viss morfologi og hvordan nukleoli ligger sammen har sammenheng med implantasjonsfrekvens og lavere grad av kromosomfeil hos embryoet (2). Når man videre i forløpet studerer delingshastigheten, ser man på hvor mange celler et embryo inneholder i de ulike stadiene. Embryoet deler seg synkront siden alle cellene deler seg innenfor omtrent samme tidsrom. Etter 44-48 timer skal det være 2-6 celler, men 4 celler foretrekkes. Når det har gått 64-72 timer er det 4-10 celler, og her foretrekkes det at det er 8 celler. På dag 4 når embryoet morulastadiet, og da er det 16 eller flere celler. Disse cellene holdes sammen ved tight junctions og desmosomer.

Blastocyst-stadiet nås in vitro på dag 5 eller 6 etter fertiliseringen. En blastocyst består av ca. 100 celler, og inneholder en indre cellemasse (der cellene vil utvikle seg til foster), trofoblast (ytte kappe med én-celle tykt lag som skal gi næring til embryoet, og blir en stor del av placenta) og blastocoel (væskefylt hulrom).

Når man skal bedømme embryoet mikroskopisk er det flere parametre som kan benyttes: delingshastighet (antall blastomerer), grad av fragmentering, tidlig deling (når den første mitotiske inndelingen skjer), blastomerens størrelse og forekomst av synlige kjerner i blastomerene (2).

## **1.3 Nedfrysing og opptining av embryoer**

Kryopreservering, nedfrysing, av embryoer benyttes for å øke sjansen til graviditet etter IVF-/ICSI behandling (2). Dette har blitt rutine ved IVF-behandling, og ved å benytte denne metoden kan man bruke alle gode embryo fra en stimulert syklus. Med dette forhindrer man at morfologisk normale embryo går til spille. Valg av embryo for nedfrysing bestemmes ved å bedømme celledeling og embryokvalitet, slik at man plukker ut dem som har mulighet til å føre til graviditet. Det første barnet som ble født etter at et embryo hadde vært fryst var i 1985 (5). I dag har denne behandlingen blitt rutine ved alle IVF-klinikker. En rapport utgitt av helsedirektoratet viser at det i Norge i 2013 ble født 438 barn etter behandlinger med innsetting av embryo som har vært fryst. Dette utgjorde ca. 22,6% av barna som kom til ved hjelp av assistert befruktning det respektive året (6).

Den eldste metoden, ”slow freeze” altså langsom nedfrysing, er brukt i denne studien. Prosedyren består av flere trinn for nedfrysing og opptining. Før nedfrysing tilføres et kryoprotektan, så blir embryoet nedkjølt til en temperatur der det lagres uten at det forekommer intracellulære forandringer. Ved opptining tines embryoet raskt til romtemperatur og til slutt fjernes kryoprotektanet. Dette er prosesser der det er viktig å minimalisere risikoene for skader på embryo (5).

Kryoprotektaner kan beskrives som en beskyttelse, og skal forhindre skade og øke overlevelse. Hovedprinsippene for beskyttelsen av cellene er at de skal beskytte mot potensiell toksisk elektrolyttkonsentrasjon, redusere effekten av dehydrering, redusere iskrystallisering, stoppe frie radikaler, danne hydrogenbindinger med polare molekyler og stabilisere cellemembranen (2, 7). Kryoprotektanene har normalt 3 egenskaper: passere passivt gjennom cellemembranen, erstatter vann inne i cellene og de er cytotoxiske ved høye konsentrasjoner. Hvilken kryoprotektan som velges avhenger av hvilken dag embryoet fryses.

Cellene kan skades av termiske, mekaniske og kjemiske krefter (7). Noen årsaker til skader er dannelse av intra- og ekstracellulære iskrystaller, kryoprotektantens cytotoxicitet, volumforandringer på grunn av osmotiske reaksjoner og skader i Zona Pellucida (2). Dannelse av ekstracellulære krystaller kan skade cellene på to måter; direkte ved at cellene sprennes eller indirekte ved at det er høye konsentrasjoner av proteiner, elektrolytter og frysestoffer i væsken når det dannes is. Intracellulære krystaller som er dannet kan skade cellen da de vokser og det på samme tid foregår en langsom opptining. Derfor har celler som fryses langsomt, best av å bli tint hurtig (7). Mekanismen bak dannelse av intracellulære iskrystaller er at det skjer en for rask nedfrysingen, slik at cellen ikke kan frakte vann ut hurtig nok. Resultat blir at det dannes iskrystaller som ødelegger cellen. Ved langsom nedfrysing og med god permeabilitet for vann gjennom cellemembranen vil ikke dette skje. Når krystallene vokser raskt inne i cellen vil konsentrasjonen av elektrolytter og proteiner øke, og medføre osmotisk stress og cellene dehydreres gjennom osmose (7). For langsom nedfrysing er heller ikke bra da det fører til langvarig eksponering av høye ekstracellulære konsentrasjoner av salter, proteiner og nødvendige tilsetningsstoffer. Embryoet kan da eksponeres for potensielt giftige oppløste stoffer i cytoplasma (5). Derfor er det en standard optimal nedfrysingshastighet ved ”slow freeze”.

Den spesifikke dehydreringen består av dehydrering og nedkjøling. Det skjer en osmotisk reaksjon når embryoet inkuberes i løsningen som inneholder kryoprotektanet. Vann diffunderer ut av cellen og kryoprotektanet absorberes i stedet. Når mengden vann reduseres i cellen, vil også risikoen for iskrystallbinding reduseres. Ved UNN fryses embryo i strå som plasseres i en tank fylt med flytende nitrogen, ved  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Opptining består av de motsatte trinnene sammenlignet med nedfrysning og dehydrering. Når embryoet skal tines erstattes kryoprotektanet med vann. Også her avhenger hurtigheten av dette på faktorer som type celle, hvilken kryoprotektan som ble benyttet og nedkjølingshastighet. Den vanligste årsak til skade ved opptining er for lav konsentrasjon av kryoprotektan. Dette kan få konsekvens ved at vann absorberes for raskt slik at cellen sveller og celle-lysis forekommer. Embryoet vil få tilbake sin normale størrelse når alt av kryoprotektan er borte fra cellen. Tilslutt legges embryoet i et vekstmedium før det overføres til livmoren (5).

#### **1.4 To ulike metoder for nedfrysing**

Tradisjonelt har metoden "slow freeze" vært benyttet i forbindelse med kryopreservering. Det er denne metoden som i dag benyttes ved UNN, og som alle blastocystene i oppgaven er fryst ned med. Denne metoden er nærmere beskrevet i kapitlet over. Den nyeste metoden benyttes i større grad både ved kryopreservering av både embryo og ubefruktede egg (8) og kalles vitrifisering. Her eksponeres embryoet for høy konsentrasjon av kryoprotektanet etterfulgt av en rask nedkjøling i flytende nitrogen. Det skjer ingen iskrystalldannelse på grunn av den svært hurtige nedfrysingen, men fører i stedet til en forglassing. Bakgrunnen er at viskositeten økes og vannet går over i fast fase sammen med cellene, og på den måten unngås dannelse av iskrystaller, både ekstracellulært og intracellulært. Det benyttes et åpent system ved vitrifikasjon, noe som betyr at det er direkte kontakt mellom løsningen som inneholder embryo og flytende nitrogen. Studier har sammenlignet de to metodene, og flere tyder i retningen at vitrifikasjon er mer pålitelig og gir bedre resultater når det brukes riktig (9) enn "slow freeze".

Siden det benyttes høye konsentrasjoner av kryoprotektaner ved vitrifikasjon kan det medføre økt risiko for toksisitet i embryoet. Dette forekommer også ved "slow freeze" – bare i mindre grad. En annen problemstilling ved vitrifikasjon er at sopp, bakterier og virus kan overleve i



flytende nitrogen. Siden embryoet er i direkte kontakt med flytende nitrogen må det tas stilling til tiltak for å forhindre forurensning og smitteoverføring (9).

### **1.5 Valg av dag for nedfrysing**

Nedfrysning av embryo kan skje ved ulike stadier, som befruktet egg kalt zygote, som delt embryo (>2 celler) eller som blastocyst. Det er ulike kriterier for de respektive stadiene, og det viktigste er å velge ut det morfologisk beste embryoet. For eksempel kan et kriterie for dag-2 embryo være at det må inneholde minst 4 celler og ha fragmentering under 20% (2). Blastocyster fryses dag 5 eller dag 6. Inndeling av blastocystene følger også morfologiske kriterier, som størrelsen av blastocysten, størrelsen av embryotall og antall celler i trofoblast.

Nedfrysing av embryo dag 2-3 sammenlignet med dag 5-6 har vært mye diskutert, og det finnes både fordeler og ulemper. Ved nedfrysing dag 2-3 vil embryoet være mer motstandsdyktig mot kryoprotektan-skade enn hos delende celler. Dette på bakgrunn av at den mitotiske spindel er mer sårbar i delende celler. Fordelen med nedfrysing dag 5-6 er at en viss seleksjon allerede har skjedd slik at man kan velge ut de beste embryoene som er morfologisk "normale". Det er slik at færre embryo utvikles til blastocytt-stadiet, men de som overlever har høy implantasjonsrate (5). Embryoet har en fase der det ikke nedfryses og det er i molarstadiet. Dette kommer av at embryoet i denne fasen er vanskelig å vurdere morfologisk.

Ved blastocyst-tilbakeføring kan man få graviditetsresultater opp til 60-70% . Dette avhenger selvsagt av hvilken pasientgruppe man velger å studere (2). Implantasjonsfrekvensen til morfologisk fine blastocyster kan ligge opp mot 50-60%. Studier gjort med tilbakeføring av ferske embryo dag 5-6 mot dag 2-3 har vist at det er signifikant høyere implantasjonstall ved blastocytt transfer dag 5-6, sammenlignet med fersk embryo transfer dag 2-3. Dette kan komme av bedre synkronisering mellom det overførte embryoet og endometrieslimhinnen i uterus (10, 11). Ved tilbakeføring av fryst og tint embryo, vil ikke dette i like stor grad ha betydning siden man da tilbakefører når det er optimalt i forhold til kvinnens syklus.

Det embryonale genomet aktiveres dag 3, når embryoet er mellom 4- til 8-cellestadiet. Dette er en av de første kritiske fasene, og de embryo som ikke klarer å igangsette aktiveringen stanser i utvikling. Under den embryonale aktiveringen starter embryoet å transkribere dets genom. Initialt er det fertiliserte embryoet inaktivt mtp. transkripsjon. Men, når komplekse

kaskader med interagerende kjerne-cytoplasmiske signaler har skjedd, fører det til dannelse av embryoets genom med en kromatinstruktur som er kompatibel med genregulering (2).

Lagring av embryo er en utbredt metode brukt på verdensbasis. Det er en metode som medfører at flere kvinner kan bli gravide og flere par kan få barn. I forbindelse med denne praksisen er det viktig å tenke på de etiske aspektene. Et eksempel på en etisk problemstilling er hva man skal gjøre med embryoene som ikke brukes av paret. Skal det brukes til forskning, destrueres eller burde par som ikke kan få barn blitt tilbudt et frosset embryo fra noen andre. I Norge er det regler og lover som er bestemmende når det gjelder hva som skal skje med embryo som er lagret.

I Norge er det regulert av Bioteknologiloven §2-16 hvor lenge embryoet kan fryses. Den sier at det er lov å lagre embryo i 5 år. De embryoene som ikke er tilbakeført innen 5 år skal destrueres eller avgis til opplæring, kvalitetssikring og forskning (12). I en evaluering av bioteknologiloven gjort i 2015 (13), blir det diskutert om loven angående lagring av embryo bør utvides slik at det blir mulighet til å søke om forlengelse av lagringstiden. Dette på bakgrunn av at det ikke er holdepunkter for at befruktete egg ødelegges dersom de lagres lengre enn 5 år. Studier viser at graviditets-raten er lavere ved bruk av nedfryste og tinte embryo sammenlignet med bruk av ferske embryo, men det er ingen signifikante bevis med tanke på økt prevalens av kongenitale- eller utviklings abnormaliteter hos barnet (5) når man sammenligner de to gruppene.

### **1.6 Embryo transfer**

Etter hormonstimulering, eggspirasjon, fertilisering, dyrkning, eller etter nedfrysing og opptining, skal eggene tilbakeføres til kvinnens livmor. Denne tilbakeføringen betegnes som embryo transfer. Det kan gjøres med ferske embryo, eller som undersøkt i dette arbeidet, etter nedfrysing og tining av embryo. Det er 3 hovedfaktorer som er avgjørende med tanke på vellykket implantasjon; normal utvikling til embryoet, optimal teknisk tilbakeføring og tilfredsstillende hormonstimulering slik at livmorslimhinnen er moden, det vil si slimhinnens og embryoets utvikling skal være synkronisert. Etter nedfrysing og opptining kan embryo transfer gjøres i kvinnens naturlige menstruasjonssyklus, eller i en hormon substituert syklus Avhengig av den primære årsaken til parets infertilitet (5).

## **2.0 MATERIALE OG METODE**

Denne oppgaven er en liten retrospektiv studie der hovedmålet er å sammenligne embryo transfer dag 5 og dag 6 i forhold til om kvinnen blir gravid og om det er et fullbåret svangerskap. Materiale til dette er hentet ut fra IVF-klinikken UNN sitt journalsystem, «in Vitro». Med hjelp fra bioingeniør på klinikken, selekterte vi først ut kvinner som hadde fått nedfrost overtallige embryo dag 5 eller dag 6 i perioden januar 2010 til januar 2015. Deretter, senere i arbeidsforløpet, selekterte vi ut de kvinnene som hadde hatt fått embryo transfer av opptint embryo i perioden januar 2010 til januar 2016. Siden alle aktuelle tinte embryo ble tatt med, ble det med noen graviditeter som enda var pågående når data ble samlet inn. De kriteriene vi valgte etter var at det var kvinner i alle aldre, som hadde fått nedfrost ned embryo samt tint embryo i aktuelle tidsperiode. Dette gjelder for begge gruppene vi har sammenlignet. Det er relativt små tall, særlig i gruppen med transfer av blc. fryst dag 6. Journalsystemet «in Vitro» er et gammelt datasystem, som ikke er egnet til å ta ut faktorer som alder, BMI, årsak til fertilitet, for å lage undergrupper. Derfor kunne man ikke ta hensyn til slike konfunderende faktorer.

Ved hjelp av datainformasjonen som ble samlet inn ble det laget en oversikt i Excel ut i fra hver kvinnes IVF/ICSI syklus-identitetsnummer, kalt "Bld" nummer. Et slikt nummer representerer en IVF- eller ICSI syklus. Følgende punkter har så blitt vurdert for hver syklus: om det var gjennomført vanlig IVF eller ICSI, registrering om embryoet var nedfrost dag 5 eller dag 6, antall strå som ble nedfrost, antall embryo transfer totalt (hvor mange blastocyster som totalt ble tint), hvor mange tinte embryo fra hhv. dag 5 og dag 6 og tilslutt resultatet av behandlingen. Denne oversikten er brukt som utgangspunkt for videre arbeid.

Litteratur til oppgaven er funnet ved hjelp av ulike kilder. Det er brukt 2 fagbøker som basis for faktakunnskaper i oppgaven, i tillegg har disse bøkene gitt meg mer kunnskap om emnene reproduksjon, infertilitet og IVF-behandling. For å finne studier og artikler til oppgaven har det blitt foretatt søk i databasen PubMed. Det var en utfordring å finne de rette ordene å søke med slik at man fant de mest relevante artiklene. Dette kommer av at det er gjort relativt få store studier for å sammenligne "slow freeze" kryopreservering dag 5 og dag 6. Det var med dette som bakgrunn at IVF-klinikken ved UNN ønsket å gjøre en liten studie for å se hva deres tall viste i forhold til de store studiene. Brukte søkeord har vært "comparison frozen-thawed day 5 and day 6 blastocysts", "frozen embryo transfer", samt "cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts". Søkene i PubMed ble gjennomført i april 2015 og mars 2016 – mai 2016. I tillegg er studier identifisert gjennom oversiktsartikler. De refererte artiklene ble valgt

ut på bakgrunn av at de inneholdt blastocyster som har vært nedfrosset og deretter tint dag 5 eller dag 6 ved hjelp av metoden "slow freeze".

Øvrige kilder som er benyttet er informasjon fra bioteknologiloven, bioteknologirådet, lovdata og helsebiblioteket. Kildehenvisningen er hentet ut ved hjelp av EndNote, og Vancouver-stil er brukt etter retningslinjer fra UiT.

## **2.1 Statistikk**

Fischers eksakte test ble valgt som metode for å sammenligne to grupper, transfer av embryo dag 5 og dag 6, fordi den kan brukes for å teste statistisk signifikans når man har små tall. Data ble testet i 2x2 tabell. En p-verdi med  $p < 0,01$  ble ansett for å være statistisk signifikant. Easy Fischer Exact Test Calculator på nett ble brukt for å regne ut resultatene.

## **2.2 Arbeidsmetoden**

Arbeidsprosessen startet med å finne veileder, og det ble Martha Hentemann, overlege ved IVF-klinikken UNN. Deretter ble tema valgt og prosjektbeskrivelse utarbeidet med formål å belyse hva oppgaven skulle omhandle. I arbeidet med prosjektbeskrivelsen måtte jeg lese meg opp på generell litteratur innenfor infertilitet, utredning og behandling ved hjelp av assistert befruktning.

Tiden etter dette ble benyttet til første del av datainnsamlingen der vi selekterte ut kvinner som fikk fryst ned overtallige embryo dag 5 og dag 6. Jeg valgte ut fagbøkene jeg ønsker å anvende, og prøvde meg på å søke etter artikler på PubMed. Neste steg var å innhente data som gav oss informasjon om resultat etter tining etterfulgt av embryo transfer. Det ble gjort manuelt ved å gå inn på kvinnene som hadde fått tint embryo, og registrere antall embryo transfer og resultatet av dette. Informasjonen ble nedskrevet på Excelark for videre bruk. Etter at datainnsamlingen var gjennomført har jeg arbeidet med informasjonen slik at det har blitt materiale til å jobbe med.

Arbeidet med selve oppgaven har foregått noe parallelt med innsamlingen, men i all hovedsak i tiden etterpå. For å få en grundig innføring i tematikken startet jeg med skrive "Bakgrunn", og på den måten lære og få en bedre forståelse av emnet, om utredning og behandling. I løpet av studiet ved UiT har vi hatt en liten innføring i infertilitet og utredning/behandling av dette, men i denne arbeidsperioden har jeg lært mye mer om temaet. Jeg har vært så heldig å fått

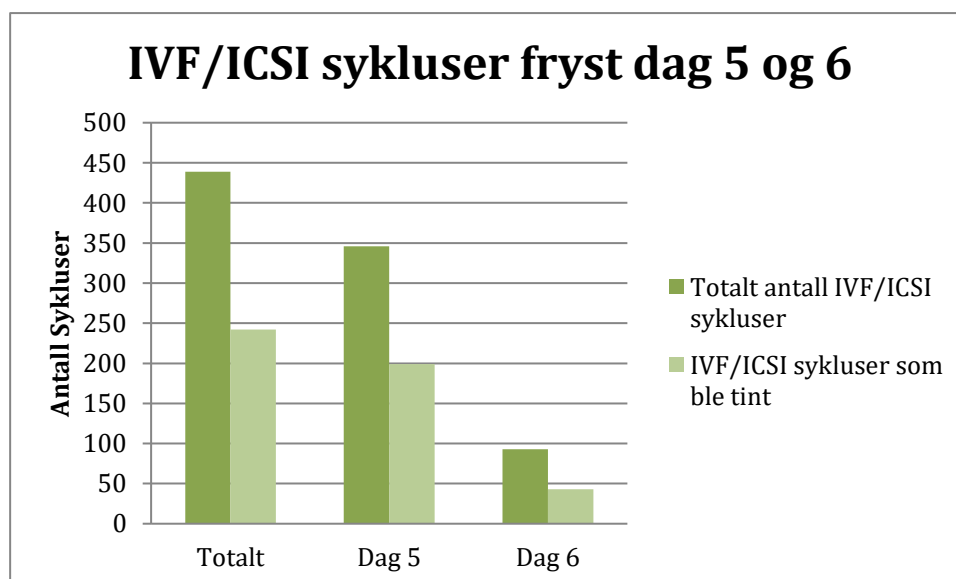
hospitere ved IVF-klinikken. Der fikk jeg være med på ulike prosedyrer som OPU (ovum pick-up), embryo transfer og sædanalyse, og vurdering av uthentede egg og befruktete egg. Har også sett hvordan ICSI utføres, og lært om hvordan nedfrysingen og opptiningen av embryo skjer i praksis.

Dette har vært et spennende tema å arbeide med. Jeg har blitt godt tatt i mot av alle de hyggelige kvinnene som arbeider på IVF-klinikken, og det har vært lærerikt å se hvordan de arbeider.

### **3.0 RESULTATER**

I dette arbeidet har alle tilfellene der det har vært utført IVF eller ICSI, og embryoene har blitt nedfrost dag 5 eller dag 6, blitt tatt med. Kvinner i alle aldre er inkludert. Dette ble gjort totalt 439 ganger i perioden januar 2010 til januar 2015. Av disse 439 IVF/ICSI syklusene ble 346 (78,82%) fryst dag 5 og 93 fryst dag 6 (21,18%). Se figur 1.

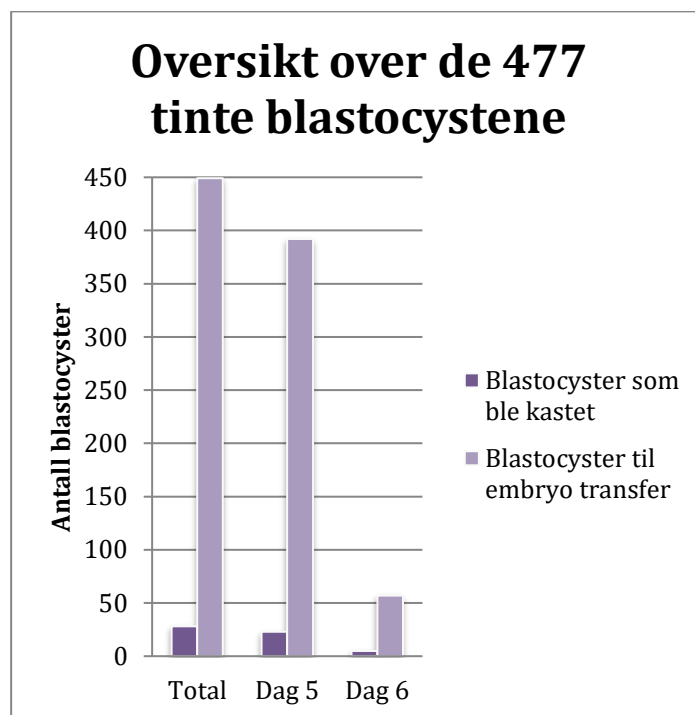
**Figur 1:** IVF/ICSI sykluser fryst dag 5 og dag 6.



Totalt ble det tint embryo for embryo transfer i 242 av de 439 IVF/ICSI syklusene. Av syklusene som ble tint var det henholdsvis 199 fra dag 5 gruppen og 43 fra dag 6 gruppen. I disse 242 syklusene ble det til sammen tint 477 blastocyster, som illustreres i figur 2. Det var 28 blastocyster ( $28/477 = 5,87\%$ ) som av ulike grunner ikke kunne brukes etter nedfrysings-

og tineprosessen. 23 av disse blastocystene var fryst dag 5 og 5 blastocyster dag 6. Grunnen til at de 28 embryoene ikke ble brukt, er at de ikke utviklet seg etter tiningen. De ble alle kastet. 449 blastocyster ( $449/477 = 94,13\%$ ) ble tint og overført til livmoren.

**Figur 2:** Oversikt over de 477 tinte blastocystene.



Frozen embryo replacement-behandlingen resulterte i at totalt 86 av de 449 blastocystene ble implantert. Av disse 86 blastocystene var det 13 aborter (hhv. 6 før 6. uke, 6 mellom 6. – 12. uke og en i 18. svangerskapsuke), 13 pågående graviditeter og 56 fullbårne svangerskap inkludert 4 tvillingfødsler (totalt 60 blastocyster som gav graviditet og levende fødte barn).

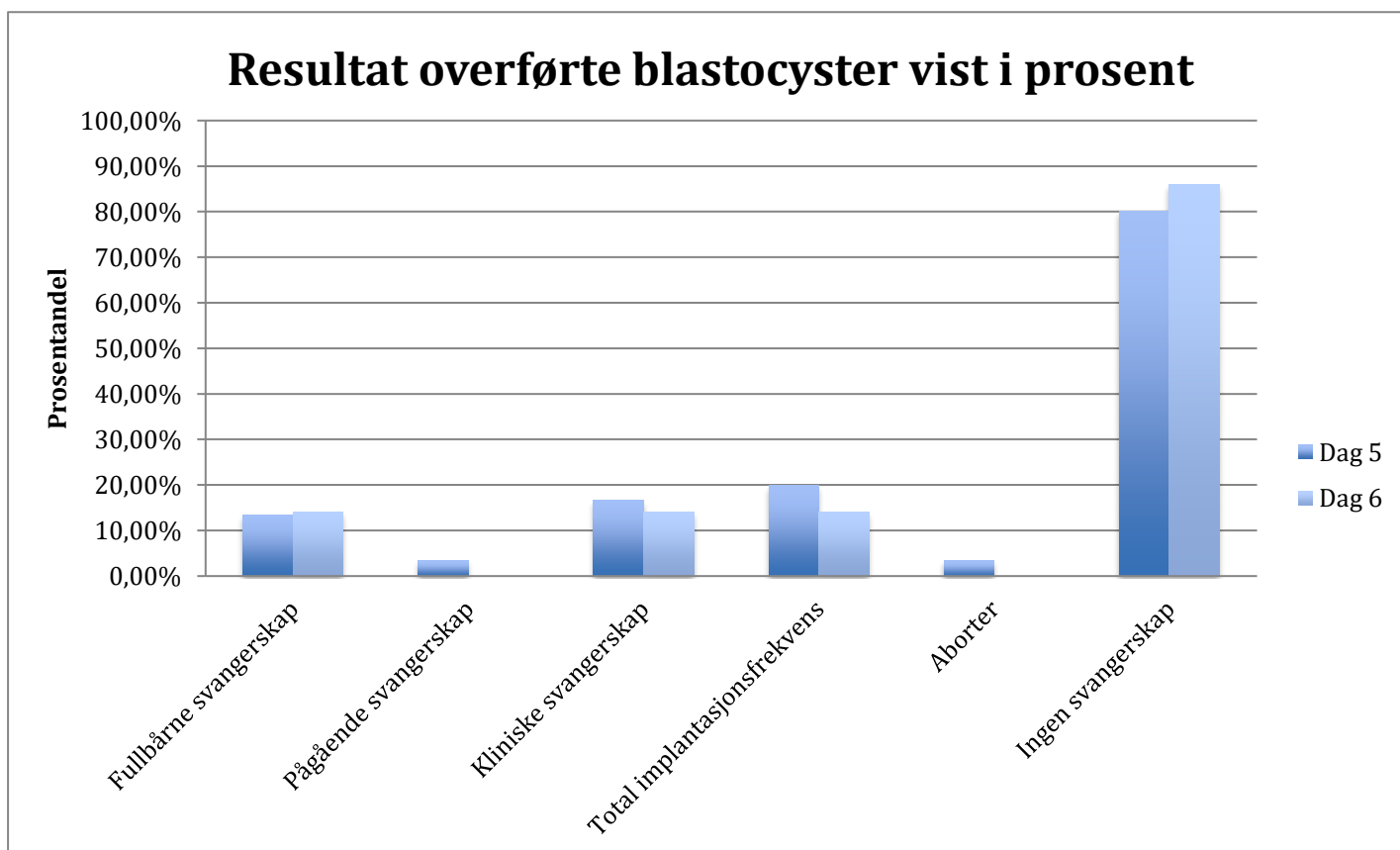
Videre er nedfrost embryo dag 5 og nedfrost embryo dag 6 sammenlignet, og dette vises i figur 3. Av de totalt 449 blastocystene som overlevde tiningen og ble overført, var det 392 blastocyster som var fryst dag 5 og 57 blastocyster som var fryst dag 6.

Fra de 392 blastocystene (100%) fryst dag 5 var det 13,3% (52/392) som gav 49 fullbårne graviditeter. Der er det inkl. 4 tvillingfødsler, der den ene tvillingfødselen består av tilbakeførte blastocyster fryst både dag 5 og dag 6 (man har bare tatt den ene blastocysten fra tvilling-graviditeten med under dag 5 gruppen). 80,1 % av blastocystene (314/392) ble ikke

implantert. Abortene utgjorde 3,3% av blastocystene (13/392), og de pågående graviditetene utgjorde 3,3% (13/392).

Dag 6 var det fryst ned 57 blastocyster totalt (100%). Her gav 14,0% (8/57) fullbårne svangerskap. Inkludert i denne gruppen er det ene embryoet som sammen med ett embryo fra dag 5 gruppen gav tvilling-graviditet. Det var 86,0% (49/57) av blastocystene som ikke ble implantert. I materialet i denne studien var det ingen aborter eller pågående graviditeter dag 6.

**Figur 3:** Resultat overførte blastocyster



**Tabell 1:** Tabell over resultatet dag 5 og dag 6 som er fremstilt i figur 3.

	Dag 5	Dag 6
Fullbårne svangerskap	13,30 % (52/392)	14 % (8/57)
Pågående svangerskap	3,30 % (13/392)	0 % (0/57)
Kliniske svangerskap (fullbårne + pågående)	16,60 % (65/392)	14 % (8/57)
Total implantasjonsfrekvens	19,90 % (78/392)	14 % (8/57)

Aborter	3,30 % (13/392)	0 % (0/57)
Ingen svangerskap	80,10 % (314/392)	86 % (49/57)

Ut fra tallene som er presentert i figur 3 og tabell 1, kan man sammenligne resultatet av embryo transfer med frosset embryo dag 5 og dag 6. Andel av blastocyster fryst dag 5 som gav fullbåret svangerskap var 13,3% (52/392), mens andelen blastocyster fryst dag 6 som gav fullbåret svangerskap var 14,0% (8/57). Dette antyder at det ikke er så stor forskjell når man ser hver gruppe for seg og sammenligner. I og med at gruppen dag 5 inneholdt blastocyster der 3,3% (13/392) ble abortert og 3,3% (13/392) er pågående graviditeter kan man anta en liten høyere tendens til implantasjon dag 5 ( $78/392 = 19,9\%$ ). Til slutt kan man se på tallene til kliniske svangerskap der man regner med pågående- og fullbårne svangerskap, og ser at det er 16,6% (65/392) dag 5, og 14% dag 6.

Ved å bruke Fischers eksakte test for små tall test er det gjort statistisk analyse på dataene som fremstår i tabellen. Signifikant nivå ble bestemt til  $p < 0,01$ . Forskjell i resultatene fra embryo transfer på dag 5 og dag 6 var ikke signifikant, se tabellene 2, 3, 4, 5 i vedlegg. Selv om man forandrer signifikant nivå til  $p < 0,05$  eller  $p < 0,1$ , blir ikke resultatene signifikant når man tester dem.

#### **4.0 DISKUSJON**

Teknologien brukt ved assistert befruktning har de siste årene utviklet seg raskt. Det er i tillegg økt oppmerksomhet mot kvaliteten av embryoene og forløp og utfall av svangerskapene (14). I dag er det, som nevnt over i oppgaven, to metoder som benyttes for kryopreservering; ”slow freeze” og vitrifikasjon. Ved UNN brukes ”slow freeze”, fremtidsplanene er at vitrifikasjon skal tas i bruk i Tromsø. Studier som er gjort for å sammenligne metodene (9) viser at de er like gode, og at det kanskje er noe bedre resultater ved brukt av vitrifikasjon.



Det er flere blastocyster i gruppe dag 5 enn gruppe dag 6 (hhv. 392 mot 57). Dette betyr at det er mange flere dag 5 blastocyster enn dag 6 blastocyster. Når man ser på perioden oppgavematerialet er hentet ut fra, observerer man at de første årene var det nesten ingen nedfrysinger dag 6 sammenlignet med den siste tiden der det var flere. Grunnen til dette er at det var første gang i aktuelle periode at man hadde ventet til dag 6 for nedfrysing ved UNN.

I forhold til de tallene som er hentet inn for denne oppgaven er det bare sett på om embryoet er blitt nedfrost dag 5 eller dag 6, for så å studere de som er tint og implantert tilbake til livmoren for å vurdere om det ble et svangerskap og utfallet av dette. I andre studier, referert til i denne oppgaven, har man kunnet ta hensyn til konfunderende faktorer. Eksempler på konfunderende faktorer er ulike sykdommer individer i studien måtte ha, alder, om det er gjort embryo transfer i naturlig syklus eller hormonstimulert syklus, BMI og embryoets kvalitet. Å justere for slike faktorer vil naturlig medvirke til at man får et mer nøyaktig bilde slik at man kan definere undergrupper hvor resultatene vil påvirkes annerledes. I en liten studie som den vi har, ville undergruppene blitt veldig små. Andre faktorer som vil være med å påvirke resultatene er kvaliteten på, og type, vekstmedium der de fertiliserte eggcellene inkuberes før dem fryses ned som blastocyst. Som nevnt før er datasystemet «in Vitro» dårlig egnet til å ta ut slik nøyaktig informasjon.

Det man ser at andre studier har gjort, er at de har evaluert kvaliteten på blastocystene (14). Blastocystene har blitt vurdert etter kvalitet, eksempel i høy kvalitets- og lav kvalitetsgrupper, og ut fra dette delt inn i kategorier. Blastocystene brukt i denne studien er av god kvalitet. Det er kriterier for hvilken kvalitet blastocysten må inneha før de kan bli nedfrost. Dem som ikke tilfredsstillt kravene vil ikke bli fryst ned. Det var ikke mulighet for videre kategorisering av blastocyster i denne studien på bakgrunn av datagrunnlaget i «in Vitro».

Før de overtallige blastocystene er blitt fryst ned, er det vanlig at man velger ett eller to embryo for embryo transfer mens dem er fersk. Tilbakeføringen av de beste, ferske embryoene skjer ofte dag 2 eller 3, men også dag 5 eller 6. Det er ikke sikkert dette har noen betydning for utfallet til det spørsmålet man ser på i denne oppgaven, men i tilfeller der man har få egg, vil det kunne skje at man sitter igjen med blastocyster som skal fryses og har noe lavere kvalitet enn dem overført ferskt.

Nedfrysing av blastocyster øker effekten av IVF-behandling ved å øke sjansen for graviditet ved hver enkel eggthenting. Det er en del store studier der formålet er å sammenligne om det er forskjell med tanke på graviditetsrater ved nedfrysing av embryo dag 5 og dag 6. I tillegg er det enda flere store studier der det er sammenlignet embryo transfer av ferske embryo dag 5 og dag 6 (10, 15). Felles for studiene er ønsket om å vite hvordan og hvilke forhold som bedrer vekst av embryoene slik at det blir et fullbåret svangerskap med fødsel av et friskt barn.

#### **4.1 Studier som viser at det forskjell mellom nedfrysing dag 5 og 6**

En retrospektiv analyse publisert i 2000 har sammenlignet embryo nedfryst dag 5 og dag 6. Her var det for dag 5 gruppen fryst 40 og overført 40, mens det for dag 6 gruppen var fryst 87 og implantert 86. Deres tall viste at antall fullbårne graviditeter der embryo var nedfryst dag 6 var signifikant redusert sammenlignet med embryo nedfryst dag 5 (16). De konkluderte med at hastigheten på utviklingen av embryoet er en viktig indikator for levedyktigheten til embryoet.

Det samme viser en retrospektiv kohortestudie fra 2008 (17). I denne studien analyserte de 172 ikke-donor, programmerte kryopreserverte embryosykluser. Studien viste signifikant høyere implantasjonsrate hos kryopreserverte dag 5 blastocyster, og en trend for høyere fødselsrate når resultatene var justert for konfunderende faktorer. Forfatterne konkludere allikevel med at blastocyster som er forsinket i utvikling dag 5 og fryses dag 6, viser akseptable resultater.

#### **4.2 Studier som viser at det ikke er signifikant forskjell mellom nedfrysing dag 5 og 6**

I en retrospektiv analyse der de sammenlignet vitrifikasjon og "slow freeze" dag 5 og dag 6, fikk de til resultat at det ikke var noen forskjell mellom de to kryopreserverende teknikkene med tanke på implantasjon og graviditet (9). Det ble utført embryo transfer av like mange blastocyster med begge metodene, altså 254 og 254 som tilsammen gir 508. De fikk også resultater som viser at kryopreservering med "slow freeze" dag 6 gir gode resultater, slik at man kan konkludere med at det gir gevinst å vente til dag 6 før nedfrysing vist embryoet ikke er modent nok på dag 5. I tillegg foreslår de at det kanskje kan være mulig å vente helt til dag 7. I en case-rapport med en 26 år gammel kvinne som har endometriose i bekken samt to tidligere mislykkede forsøk med IVF og embryo transfer, en ble det gjort embryo transfer med 3 blastocyster der en var fryst dag 6 og to var fryst dag 7. Resultatet her viste tvilling-

graviditet etter transfer av dag 7 fryste blastocyster (18). Dette er, i følge forfatterne, det første beskrevne fullbårne svangerskapet der blastocyst er nedfrost dag 7 og som har resultert i fullbåret svangerskap.

Resultatene av en retrospektiv klinisk evaluering, der kryopreservering av blastocyster ble evaluert over en 3-års periode, viste at det ikke hadde noen signifikant betydning om blastocysten ble fryst dag 5 eller dag 6 (19). Det var 154 pasienter der 60 pasienter hadde embryo transfer dag 5 og 94 pasienter dag 6. De observerte ingen signifikante forskjeller mellom gruppene i forhold til pasientens alder, blastocyst overlevelse, morfologi hos den tinte blastocysten, klinisk graviditetsrate og implantasjonsrate. En teori har vært at embryo som når blastocyst-stadiet raskere var sterkere eller mer overlevningsdyktig enn de som ble utviklet senere. Dette viser denne og flere studier, at ikke stemmer (19, 20).

En engelsk observerende kohortestudie viser at de kliniske utfallene, når man sammenlignet nedfrysing dag 5 og dag 6, ikke var signifikant forskjellig (21). Dette er en stor studie der de så at forsinket blastocystutvikling ikke påvirker utfallet av prosessen nedfrysing og tining. Det er høy-kvalitets blastocyster som var inkludert, og de har justert for konfunderende faktorer for å minimere bias. Totalt var det 642 tinte blastocystoverførings-sykluser som ble inkludert, 314 dag 5 og 328 dag 6. I disse 624 syklusene var det 1130 fryste blastocyster som ble tint. 987 (87%) blastocyster overlevde tiningen og 973 blastocyster (86%) ble implantert. Behandlingen resulterte i 298 graviditeter og 184 fullbårne svangerskap. Disse fordelte seg med graviditet hos 46% av blastocystene fryst dag 5, og 44% hos blastocystene fryst dag 6. Andelen fullbårne svangerskap var 29% hos dag 5 gruppen og 28,8% hos dag 6 gruppen. Resultatene viste at embryo som er nedfrost dag 5 og dag 6 har like overlevelses-, graviditets- og abortrate, når det gjøres embryo transfer etter tining på like vilkår for alle blastocystene.

I en stor systemisk gjennomgang og metaanalyse (22) av kontrollerte studier var det inkludert 2502 embryo transfer som var fryst dag 5 eller dag 6. Resultatene viste at det ikke var signifikant forskjell etter tiningen med tanke på overlevelse mellom gruppene. Det studien først viste var at det er en signifikant forskjell for klinisk graviditet og pågående graviditet/fødselsrate for dag 5 fryste embryo i forhold til dem fryst dag 6. Men i de analysene der dag 5 og dag 6 blastocystene hadde lik morfologisk kvalitet på nedfrysingstidspunktet var det ingen forskjell for klinisk graviditet og pågående graviditet/fødselsrate.

### 4.3 Konklusjon

Det er flere studier som har sett på samme problemstilling som oppgaven handler om. Et flertall av dem viser ikke signifikant forskjell mellom embryo fryst dag 5 og dag 6 mtp. antall fullbårne svangerskap dersom blastocystene har nådd samme morfologiske utvikling ved nedfrysing, selv om noen måtte dyrkes til dag 6.

Tall fra IVF-klinikken på UNN viser heller ingen signifikant forskjell i andelen fullbårne graviditeter respektive implantasjon i de to gruppene. Når vi testet det med Fischers eksakte test fikk vi et ikke-signifikant svar for p-verdi  $<0,01$ ,  $p<0,05$  eller  $p<0,1$ . Dette er en liten studie med små tall og relativt liten forskjell i svangerskapsrate, som er forklaringen på hvorfor testen ikke er signifikant.

Grunnen til at det ikke var noen aborter i gruppe 6 kan forklares i at det var flere embryo transfer av fryste dag 5 blastocyster. Det samme gjelder pågående graviditeter og tvillingfødsler. Som nevnt tidligere ser man ut av materialet at det først i de siste årene i den undersøkte tidsperioden ble det fryst mer og mer blc. på dag 6. Noe som forklarer forskjellen i det totale antall blastocyster i de to gruppene.

Andre, større studier, viser at det er verdt å la blastocyster som ikke er fult utviklet på dag 5 vente til dag 6 før man fryser dem. Dette kan man si på bakgrunn av at dag 6 gruppen har like gode resultater som dem fryst dag 5. Blastocystens morfologiske kvalitet virker til å være betydningsfull for utfallet, og det er dette man ser de nyere studiene konkluderer med (14, 21).

Resultatene fra denne lille studien ved IVF-klinikken ved UNN viser, som andre større studier, at det er hensiktsmessig å fryse blastocystene på dag 6, selv om de er litt forsinket i utviklingen på dag 5. Resultatene bør bekreftes av større studier som også tar hensyn til konfunderende faktorer.

## **REFERANSER**

1. Bioteknologirådet. Assistert befruktning 2010 [updated 17.03.2016; cited 2016 18.05]. Available from: <http://www.bioteknologiradet.no/temaer/assistert-befruktning/>.
2. Hreinsson J, Hamberger L, Hardarson T. Infertilitet - Utredning och behandling genom assisterad befruktning: Studentlitteratur; 2005. 224 p.
3. Bioteknologirådet. Stamceller 2010 [updated 17.03.2016; cited 2016 18.05]. Available from: <http://www.bioteknologiradet.no/temaer/stamceller/>.
4. Folkehelseinstituttet h. Infertilitet - behandling [Available from: <http://www.helsebiblioteket.no/pasientinformasjon/gynekologi/nedsatt-fruktbarhet-behandling;jsessionid=44CB2B8D6CFC77C2F0FD0D8C44063AF5>].
5. Togas Tulandi RGG. Preservation of fertility. Togas Tulandi RGG, editor: Taylor and Francis Group; 2004.
6. Helsedirektoratet. Årsrapport 2015 - Assistert befruktning utført i 2013 [Available from: [https://helsedirektoratet.no/Documents/Bioteknologi/Rapportering 2015 - Assistert befruktning utført i 2013.pdf](https://helsedirektoratet.no/Documents/Bioteknologi/Rapportering%202015%20-%20Assistert%20befruktning%20utf%C3%B8rt%20i%202013.pdf)].
7. legeförening Tfdn. Kryobiologi - nedfrysing og oppbevaring av levende celler og vev 2004 [Available from: <http://tidsskriftet.no/article/1084213/>].
8. Bioteknologinemnda. Bruk av vitrifiede ubefruktede egg i assistert befruktning 2014 [Available from: <http://www.bioteknologiradet.no/filarkiv/2014/03/Vitrifiede-egg.pdf>].
9. Liebermann J, Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. Fertility and sterility. 2006;86(1):20-6.
10. Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. Fertility and sterility. 2001;75(6):1126-30.
11. Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. The Cochrane database of systematic reviews. 2012;7:Cd002118.
12. Lovdata. [Available from: [https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2003-12-05-100/KAPITTEL 29](https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2003-12-05-100/KAPITTEL_29)].
13. Helsedirektoratet. Evaluering av bioteknologiloven 2015 2015 [Available from: <https://helsedirektoratet.no/Lists/Publikasjoner/Attachments/997/Evaluering-av-bioteknologiloven-2015-IS-2360.pdf>].
14. Yang H, Yang Q, Dai S, Li G, Jin H, Yao G, et al. Comparison of differences in development potentials between frozen-thawed D5 and D6 blastocysts and their relationship with pregnancy outcomes. Journal of assisted reproduction and genetics. 2016.
15. Elgindy E, Elsedek MS. Day 5 expanded blastocysts transferred on same day have comparable outcome to those left for more extended culture and transferred on day 6. Journal of assisted reproduction and genetics. 2012;29(10):1111-5.
16. Marek D, Langley M, McKean C, Weiland L, Doody KM, Doody KJ. Frozen Embryo Transfer (FET) of Day 5 Blastocyst Embryos Compared to Transfer of Day 6 Blastocyst Embryos. Fertility and sterility. 2000;74(3, Supplement 1):S52-S3.
17. Levens ED, Whitcomb BW, Hennessy S, James AN, Yauger BJ, Larsen FW. Blastocyst development rate impacts outcome in cryopreserved blastocyst transfer cycles. Fertility and sterility. 2008;90(6):2138-43.

18. Sills ES, Sweitzer CL, Morton PC, Perloe M, Kaplan CR, Tucker MJ. Dizygotic twin delivery following in vitro fertilization and transfer of thawed blastocysts cryopreserved at day 6 and 7. *Fertility and sterility*. 2003;79(2):424-7.
19. Veeck LL, Bodine R, Clarke RN, Berrios R, Libraro J, Moschini RM, et al. High pregnancy rates can be achieved after freezing and thawing human blastocysts. *Fertility and sterility*. 2004;82(5):1418-27.
20. Behr B, Gebhardt J, Lyon J, Milki AA. Factors relating to a successful cryopreserved blastocyst transfer program. *Fertility and sterility*. 2002;77(4):697-9.
21. El-Toukhy T, Wharf E, Walavalkar R, Singh A, Bolton V, Khalaf Y, et al. Delayed blastocyst development does not influence the outcome of frozen-thawed transfer cycles. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2011;118(13):1551-6.
22. Sunkara SK, Siozos A, Bolton VN, Khalaf Y, Braude PR, El-Toukhy T. The influence of delayed blastocyst formation on the outcome of frozen-thawed blastocyst transfer: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2010;25(8):1906-15.

## **Vedlegg: Statistikk, Fischer eksakte test**

**Tabell 2:** Test av total implantasjonsfrekvens mot ingen graviditet

	Dag 5	Dag 6	Total
Total implantasjonsfrekvens	78	8	86
Ikke gravid	314	49	363
Total	392	57	449

Fischer eksakt test statistisk verdi er 0,368739. Resultatet er ikke signifikant med  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,10$ .

**Tabell 3:** Test av fødte barn mot ikke fullbåret svangerskap inkl. pågående svangerskap og aborter

	Dag 5	Dag 6	Total
Fullbårne svangerskap	52	8	60
Ikke fullbårne svangerskap	340	49	389
Total	392	57	449

Fischer eksakt test statistisk verdi 0,836254. Resultatet er ikke signifikant med  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,10$ .

**Tabell 4:** Kliniske svangerskap mot ikke fullbåren graviditet inkl. aborter.

	Dag 5	Dag 6	Total
Kliniske svangerskap	65	8	73
Ikke gravid samt abort	327	49	376
Total	392	57	449

Fischer eksakt test statistisk verdi er 0,705058. Resultatet er ikke signifikant med  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,10$ .

**Tabell 4:** Antall aborter

	Dag 5	Dag 6	Total
Abort	13	0	13
Ikke abort	379	57	436
Total	392	57	449

Fischer eksakt test statistisk verdi er 0,387718. Resultatet er ikke signifikant med  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,10$ .