

Received: 05.12.2011

Accepted: 19.01.2012

Published: 30.04.2012

Powikłania położnicze wspomaganego rozrodu

Obstetric complications after assisted reproductive technology

¹ Zakład Zdrowia Prokreacyjnego, Instytut Matki i Dziecka w Warszawie, ul. Kasprzaka 17 A, 01-211 Warszawa.

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Artur Jakimiuk

² Klinika Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej Centralnego Szpitala Klinicznego MSWiA w Warszawie, ul. Wołoska 137, 02-507 Warszawa. Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Artur Jakimiuk

Praca finansowana ze środków własnych

Streszczenie

Od czasu, kiedy na świat przyszło pierwsze dziecko urodzone w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego, gwałtownie wzrasta liczba dzieci poczętych przy zastosowaniu technik rozrodu wspomaganego. W chwili obecnej są one szeroko stosowane w leczeniu niepłodności. Szacuje się, że na całym świecie w ten sposób urodziło się dotychczas blisko milion noworodków. Główną przyczynę powikłań związanych z rozrodem wspomaganym stanowią ciąży mnogie. W USA i Europie nawet około 30% bliźniąt zostaje poczętych w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego, mikroiniekcji plemnika do komórki jajowej lub transferu zarodka mrożonego. Metody te wiążą się niestety ze zwiększonym ryzykiem uzyskania ciąży mnogich, a co za tym idzie – ze wzrostem ryzyka wcześniactwa, niskiej masy urodzeniowej, a także śmiertelności okołoporodowej dzieci. Niektóre publikowane ostatnio badania wskazują również, że także ciąży pojedyncze będące wynikiem zastosowania technik wspomaganego rozrodu częściej powikłane są porodem przedwczesnym, niską masą urodzeniową noworodka, wadami wrodzonymi u dzieci, zwiększoną śmiertelnością okołoporodową noworodków oraz innymi ciężkimi powikłaniami położniczymi. Ponadto wykazano, że same czynniki decydujące o niepłodności u rodziców mogą wpływać na występowanie powikłań w czasie ciąży i porodu. W końcu także sama procedura związana z zapłodnieniem pozaustrojowym niesie ryzyko powikłań u poczętych w ten sposób dzieci. Należy tu wspomnieć o sztucznej indukcji owulacji, która może wpłynąć na środowisko wewnątrz pęcherzyków oraz struktury oocytu, ekspozycji zarówno nasienia, jak i embriionów na czynniki zewnętrzne, co może prowadzić do zaburzenia ich naturalnej funkcji, jak również zamrażaniu i manipulowaniu przy oocytach i embriionach, między innymi w czasie diagnostyki preimplantacyjnej.

Słowa kluczowe: rozród wspomagany, zapłodnienie *in vitro*, powikłania położnicze, poród przedwczesny, niska masa urodzeniowa

Summary

Since the first live birth resulting from *in vitro* fertilization (IVF), there has been a dramatic rise in the number of infants born as a result of this technology. Assisted reproductive technologies (ART) are now widely used in the treatment of human infertility. It is likely that well over 1 million babies have been born worldwide using ART. The majority of perinatal morbidity after assisted reproductive technology is due to multiple pregnancies. In United States and Europe even 30% of twins are conceived by IVF, intracytoplasmic sperm injection (ICSI), or frozen embryo replacement (FER). ART carries a significantly increased risk of multiple pregnancies, which are associated with a higher rate of prematurity and low birth weights, and carry well-established risks of morbidity to the child. Many recent studies have suggested also that even singleton pregnancies are at increased risk for preterm birth, low birth weight, congenital anomalies, perinatal mortality and several other pregnancy-related complications. In addition, it has been shown that the infertility characteristics of the parents may influence the perinatal outcome. Finally, procedural factors related to fertility treatments themselves may confer health risks to ART children. These include the artificial induction of ovulation with the possibility of changes in follicle milieu and oocyte structure, exposure of sperm and embryos to *in vitro* environments which might change their natural function, freezing and manipulation of oocytes and embryos.

Key words: assisted reproductive technology (ART), *in vitro* fertilization, obstetric complications, preterm delivery, low birth weight

Pierwsze dziecko urodzone w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego, Louise Brown, przyszła na świat w Wielkiej Brytanii ponad 33 lata temu, 25 lipca 1978 roku. Narodziny te były zwieńczeniem wieloletniej pracy badawczej i doświadczalnej naukowców z kilku krajów. Przełomowego zabiegu IVF (*in vitro fertilisation*), w wyniku którego mała Louise przyszła na świat, dokonali 10 listopada 1977 roku Edwards i Steptoe⁽¹⁾.

Od tego czasu nastąpił ogromny postęp zarówno w technikach stymulacji owulacji, pobierania komórki jajowej, jak i metodach jej zapłodnienia oraz hodowli embriónów, co sprawiło, że w ostatniej dekadzie już ponad jeden procent dzieci w USA rodzi się dzięki zapłodnieniu pozaustrojowemu. Główną przyczyną takiego stanu rzeczy jest wzrastająca częstość występowania niepłodności zarówno wśród kobiet, jak i mężczyzn, a metody wspomaganego rozrodu stanowią dla tych par jedyną możliwość posiadania własnego biologicznego potomstwa.

Niestety, wraz ze wzrostem liczby zabiegów IVF, przeprowadzanych również u kobiet coraz starszych, obciążonych chorobami przewlekłymi, wzrasta częstość występowania powikłań zarówno w trakcie ciąży, jak i porodu. Co prawda istnieją doniesienia mówiące o tym, że już sam fakt występowania niepłodności predysponuje do występowania porodu przedwczesnego oraz niskiej i bardzo niskiej masy urodzeniowej noworodka, jednak sami autorzy, między innymi Kapiteijn i wsp. w pracy z 2006 roku, zauważają, że statystycznie więcej powikłań dotyczy jednak dzieci matek, które zaszły w ciążę w wyniku metod rozrodu wspomaganego⁽²⁾.

Jedną z głównych przyczyn powikłań położniczych związanych z ciążami po zapłodnieniu pozaustrojowym jest istotnie częstsze występowanie ciąż mnogich po IVF, niż ma to miejsce w przypadku ciąż spontanicznych. Ocenia się, że zarówno w Europie, jak i w USA 20-30% ciąż bliźniaczych jest wynikiem zapłodnienia *in vitro*, podczas gdy spontaniczne ciążę bliźniacze stanowią jedynie 1% wszystkich ciąż, a ciążę jednokosmówkowe – około 22% ciąż bliźniaczych spontanicznych i tylko 2% po IVF. Przykładowo w USA 29% ciąż po IVF jest bliźniaczych i aż 3,7% trojaczych. Większość powikłań związanych z ciążami będącymi wynikiem zastosowania technik wspomaganego rozrodu wynika właśnie z występowania większej liczby ciąż mnogich. W związku z tym ponad 60% bliźniaków rodzi się przedwcześnie, a ponad 50% ma niską masę urodzeniową (odpowiednio dla ciąż pojedynczych wartości te wynoszą 14% i 9%). Wobec przytoczonych danych na temat wzrostu liczby ciąż bliźniaczych badacze z Australii postanowili przeanalizować, jaki wpływ na przebieg i ewentualne powikłania ciąży bliźniaczej ma zastosowanie technik rozrodu wspomaganego w porównaniu ze spontanicznie powstałą ciążą mnogą. Przeanalizowano pod kątem wystąpienia powikłań ciąży i porodu, a także późniejszych hospitalizacji dzieci do 3. roku życia 700 ciąż bliźniaczych po IVF, mikro-

iniekcji plemnika do komórki jajowej (*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI) oraz dojajowodowym transferze gamet (*gamete intrafallopian transfer*, GIFT) i porównano je z 4097 spontanicznymi ciążami bliźniaczymi z lat 1993-2000. Stwierdzono, że ciążę bliźniacze po IVF wiążą się ze statystycznie większym ryzykiem porodu przedwczesnego i niskiej masy urodzeniowej niż w przypadku spontanicznych ciąż bliźniaczych. Zaobserwowano także, że dzieci z ciąż bliźniaczych po IVF częściej są przyjmowane na OIOM bezpośrednio po porodzie, jak również hospitalizowane na tym oddziale do 3. roku życia ($p < 0,001$)^(1,3).

Do powikłań stwierdzanych istotnie statystycznie częściej ($p < 0,001$) w przypadku ciąż bliźniaczych powstałych w wyniku rozrodu wspomaganego należy zaliczyć również cukrzycę ciążową, nadciśnienie tętnicze indukowane ciążą, przedwczesne odpyływanie płynu owodniowego oraz konieczność zakończenia ciąży drogą cięcia cesarskiego. Do takich wniosków doszli badacze z Izraela w opublikowanej w 2007 roku pracy obejmującej porównanie przebiegu ciąży i porodu w ciążach bliźniaczych powstałych w wyniku IVF i indukcji owulacji oraz w ciążach bliźniaczych spontanicznych. Co ciekawe, w całej badanej grupie stwierdzono istotnie statystycznie rzadsze występowanie wad wrodzonych u dzieci po indukcji owulacji⁽⁴⁾.

Z kolei w prospektywnym badaniu przeprowadzonym we Włoszech na grupie obejmującej 233 ciążę bliźniacze dwuowodniowe i dwukosmówkowe (84 po IVF oraz 133 ciążę spontaniczne) Vasario i wsp. nie stwierdzili istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami pod względem czasu trwania ciąży w momencie porodu, śmiertelności okołoporodowej noworodków oraz częstości występowania wad wrodzonych. Co prawda liczba cięć cesarskich w grupie po IVF była większa, ale nie osiągnęła ona istotności statystycznej⁽⁵⁾.

Należy jednak podkreślić, że choć główną przyczyną powikłań w przebiegu ciąż powstałych w wyniku rozrodu wspomaganego są ciążę mnogie, również w ciążach pojedynczych częstość występowania niektórych powikłań jest większa niż w przypadku ciąż spontanicznych. Już w 2002 roku Schieve i wsp. zaobserwowali, że noworodki z niską (< 2500 g) i bardzo niską (< 1500 g) masą urodzeniową rodzą się 1,8 razy częściej w przypadku ciąż po IVF niż ciąż spontanicznych w grupie kontrolnej (porównywalnej pod względem rodności i wieku matek)⁽⁶⁾.

Także w opublikowanej przez Helmerhorsta i wsp. w 2004 roku metaanalizie 27 badań na ten temat stwierdzono podobny wzrost częstości występowania zarówno niskiej, jak i bardzo niskiej masy urodzeniowej w przypadku ciąż pojedynczych powstałych w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego w porównaniu z ciążami spontanicznymi. Co ciekawe, zaobserwowano także wzrost częstości występowania w grupie dzieci po IVF zarówno wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu płodu (RR 1,4, 95% CI 1,2-1,7), jak i porodu przedwczesnego (RR 2,0, 95% CI 1,8-2,3). Podobne wnioski

przedstawili w swojej metaanalizie Jackson i wsp.^(7,8) Podobne konkluzje zawarte są także w najnowszej, opublikowanej w 2009 roku, metaanalizie 17 badań, autorstwa McDonald i wsp. Obejmuje ona 31 032 ciąży pojedyncze po IVF i 81 119 ciąż pojedynczych spontanicznych. We wnioskach autorka stwierdza, że w przypadku ciąż po IVF statystycznie częściej występowały poród przedwczesny, niska (<2500 g) oraz bardzo niska masa urodzeniowa (<1500 g), a także wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu niż w przypadku ciąż spontanicznych⁽⁹⁾.

Nadal nie do końca wiadomo, co jest bezpośrednią przyczyną występowania powikłań w ciąży po IVF. Niewątpliwie składa się na nie wiele czynników, począwszy od terapii hormonalnej i leków podawanych matce w czasie indukcji owulacji i implantacji, poprzez zabiegi związane z pozyskiwaniem oocytów, manipulacje z gametami w trakcie samego zapłodnienia i hodowlę zarodków, a także stan hormonalny matki w momencie implantacji i w początkowym okresie ciąży, będący konsekwencją uprzednio przeprowadzonej kuracji hormonalnej. Wydaje się, że wszystkie wymienione czynniki mają pewien wpływ na występowanie powikłań w trakcie ciąży. Z tego też powodu poznanie dokładnych patomechanizmów prowadzących do wystąpienia zaburzeń w trakcie ciąży pozwoli na ich lepszą diagnostykę i skuteczne leczenie.

Na uwagę zasługuje opublikowana w 2011 roku przez Kalrę i wsp. metaanaliza obejmująca ponad 31 000 noworodków urodzonych z ciąż pojedynczych po IVF w USA. Zaobserwowano, że częstość występowania porodu przedwczesnego i niskiej masy urodzeniowej noworodka była statystycznie wyższa ($p < 0,01$) w przypadku ciąż po transferze świeżych zarodków, niż gdy embriotransfer dotyczył zarodków uprzednio mrożonych. Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic w przypadku pacjentek, które były biorecipientkami oocytu od dawcy – uzyskano podobne wyniki w przypadku transferu zarodka świeżego i mrożonego. Podobne rezultaty w przypadku ciąż po transferze zarodków z oocytów dawczyni przedstawiono w doniesieniach badaczy z Danii. Oparte jest ono na rejestrze urodzeń z lat 1994-2008 i obejmuje 27 384 dzieci urodzonych w Danii z ciąż pojedynczych uzyskanych spontanicznie, po IVF, ICSI oraz transferze mrożonych zarodków. Autorzy poddali analizie masę urodzeniową, czas trwania ciąży, liczbę dzieci z niską masą urodzeniową, porody przedwczesne oraz zgony okołoporodowe. We wnioskach stwierdzono, że dzieci urodzone w wyniku IVF mają statystycznie o 65 g niższą masę urodzeniową niż noworodki z ciąż spontanicznych; w przypadku transferu mrożonych zarodków noworodki były statystycznie aż o 167 g cięższe w chwili porodu niż dzieci z ciąż po transferze świeżego zarodka. Ponadto ryzyko niskiej masy urodzeniowej i porodu przedwczesnego było najwyższe po IVF/ICSI ($p < 0,0001$)^(1,10,11).

W opublikowanym ostatnio doniesieniu z Australii Shih i wsp. przedstawili dane mówiące o takim samym ryzyku wystąpienia niskiej masy urodzeniowej noworodka w przypadku ciąży pojedynczej po transferze mrożonego zarodka oraz ciąży pojedynczej spontanicznej. Powyższa obserwacja może wskazywać na zaburzenia hormonalne występujące w trakcie stymulacji owulacji jako jeden z czynników mający wpływ na dalszy rozwój i przebieg ciąży⁽¹²⁾.

W ostatnich latach pojawiły się także doniesienia mówiące o wpływie zastosowanej techniki rozrodu wspomaganego na przebieg i powikłania w ciąży. W opublikowanych w 2002 roku pracach autorzy przytaczają dane wskazujące na większą częstość występowania wad wrodzonych oraz zaburzeń chromosomalnych w zakresie chromosomów płciowych u dzieci urodzonych w wyniku mikromanipulacji, między innymi ICSI, niż w wyniku klasycznego IVF. Nie jest jednak do końca pewne, czy występowanie obserwowanych wad jest wynikiem samej mikromanipulacji, jakiej poddawane są gamety, czy też wiąże się z zaburzeniami genetycznymi przekazywanymi od ojca w przypadku czynnika męskiego będącego przyczyną niepłodności. Powyższa obserwacja wymaga dalszych badań, chociażby ze względu na fakt, że metoda ICSI stanowi coraz większy odsetek zabiegów rozrodu wspomaganego, w niektórych ośrodkach dochodząc nawet do 50% wszystkich przeprowadzanych procedur⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Badając powikłania wynikające z zastosowania technik wspomaganego rozrodu, nie sposób nie wspomnieć o wadach wrodzonych, jakie mogą wystąpić u dzieci urodzonych w wyniku zastosowanego leczenia. W literaturze dostępnych jest niewiele doniesień na ten temat. Na uwagę zasługuje praca Krieg i wsp. z 2008 roku. Jest to badanie retrospektywne, zostało przeprowadzone w latach 1989-2002 w stanie Iowa w USA. Dane wykorzystane w opracowaniu pochodziły ze stanowych rejestrów urodzeń i zgonów. Obejmuje ono 1462 dzieci urodzonych w wyniku IVF oraz 343 poczętych na drodze inseminacji – grupę tę porównano z 8422 dzieci z ciąż spontanicznych. Stwierdzono, że 90 dzieci z IVF (6,2%) oraz 17 z grupy po inseminacji (5,0%) miało duże wady wrodzone, w porównaniu z 369 (4,4%) dzieci z ciąż spontanicznych. Również częstość wad w grupie po IVF wzrosła, jeżeli analizowano tylko ciąż pojedyncze. Obserwowane wady dotyczyły najczęściej układu sercowo-naczyniowego oraz kostno-szkieletowego. W oparciu o dostępne dane badacze podkreślają, że w grupie po zapłodnieniu pozaustrojowym nie występowała zależność pomiędzy istnieniem wad a przeprowadzeniem ICSI lub embriotransferem zarodka mrożonego⁽¹⁶⁾.

Przedmiotem badań naukowców stał się także wpływ wieku matki w chwili przeprowadzenia u niej zabiegu zapłodnienia pozaustrojowego na przebieg ciąży. W bardzo ciekawym doniesieniu z 2008 roku autorzy podjęli się oceny przebiegu i powikłań ciąż oraz poro-

du u 71 kobiet bioczyń oocytu w porównaniu ze 108 kobietami po 38. roku życia, które zaszły w ciążę w wyniku IVF w USA w latach 2001-2005. Analizowano występowanie powikłań ciąży, takich jak: stan przedzrątkowy, cukrzyca, poród przedwczesny, przedwczesne pęknięcie błon płodowych, nieprawidłowości łożyska. Porównano między grupami także: czas trwania ciąży w momencie porodu, drogę porodu, masę urodzeniową noworodka, punktację w skali Apgar. Uzyskane w oparciu o analizę danych wyniki nie wykazały istotnych statystycznie różnic pomiędzy obiema grupami zarówno w czasie ciąży, jak i porodu⁽¹⁷⁾.

Podsumowując przedstawione powyżej wyniki opublikowanych w ostatniej dekadzie badań na temat występowania powikłań położniczych w ciążach po zapłodnieniu pozaustrojowych, należy przede wszystkim podkreślić, że największym czynnikiem ryzyka powikłań po IVF jest ciąża mnoga i związane z nią komplikacje zarówno przebiegu samej ciąży, jak i porodu. Istotnie statystycznie częściej występują w ciąży mnogiej po IVF zarówno poród przedwczesny, jak i niska masa urodzeniowa dziecka, a także nadciśnienie tętnicze indukowane ciążą oraz cukrzyca ciężarnych. Z kolei w przypadku ciąż pojedynczych oprócz przedwczesnego zakończenia ciąży i związanej z tym niskiej masy urodzeniowej noworodka częściej spodziewać się także można wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu płodu. Niestety, również u dzieci po zapłodnieniu pozaustrojowym częściej stwierdza się duże wady wrodzone dotyczące układu sercowo-naczyniowego i kostno-szkieletowego. Ponadto pochodzenie ciąży (z transferu zarodka świeżego czy mrożonego) ma wpływ na występowanie w jej trakcie powikłań, podczas gdy samo pochodzenie oocytu (własny czy dawczyni) nie przekłada się na ryzyko powikłań w czasie jej trwania. Być może dzięki dogłębnemu poznaniu mechanizmów biorących udział w gametogenezie oraz zapłodnieniu i implantacji, udoskonaleniu protokołów stymulacji owulacji (w szczególności zapobieganie zespołowi hiperstymulacji jajników), a także mikromanipulacji, późniejszej hodowli embrionów i ich przechowywania uda się zmniejszyć liczbę powikłań występujących w trakcie ciąży u kobiet leczących się z powodu niepłodności metodami rozrodu wspomaganego. Także badania mające na celu lepsze wyodrębnienie grup ryzyka mogą umożliwić szybsze diagnozowanie i leczenie powikłań. Najłatwiejsze wydaje się w chwili obecnej ograniczenie liczby embrionów podawanych jednorazowo w trakcie zabiegu, a co za tym idzie redukcja ilości ciąż mnogich występujących w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego.

PIŚMIENNICTWO: BIBLIOGRAPHY:

1. Kalra S.K., Barnhart K.T.: In vitro fertilization and adverse childhood outcomes: what we know, where we are going, and how we will get there. A glimpse into what

lies behind and beckons ahead. *Fertil. Steril.* 2011; 95: 1887-1889.

2. Kapiteijn K., de Bruijn C.S., de Boer E. i wsp.: Does subfertility explain the risk of poor perinatal outcome after IVF and ovarian hyperstimulation? *Hum. Reprod.* 2006; 21: 3228-3234.
3. Hansen M., Colvin L., Petterson B. i wsp.: Twins born following assisted reproductive technology: perinatal outcome and admission to hospital. *Hum. Reprod.* 2009; 24: 2321-2331.
4. 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: 173-178.
5. Vasario E., Borgarello V., Bossotti C. i wsp.: IVF twins have similar obstetric and neonatal outcome as spontaneously conceived twins: a prospective follow-up study. *Reprod. Biomed. Online* 2010; 21: 422-428.
6. Schieve L.A., Meikle S.F., Ferre C. i wsp.: Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 731-737.
7. 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. *BMJ* 2004; 328: 261-265.
8. Jackson R.A., Gibson K.A., Wu Y.W., Croughan M.S.: Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet. Gynecol.* 2004; 103: 551-563.
9. McDonald S.D., Han Z., Mulla S. i wsp.: Knowledge Synthesis Group: Preterm birth and low birth weight among *in vitro* fertilization singletons: a systematic review and meta-analyses. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2009; 146: 138-148.
10. Pinborg A., Loft A., Aaris Henningsen A.K. i wsp.: Infant outcome of 957 singletons born after frozen embryo replacement: the Danish National Cohort Study 1995-2006. *Fertil. Steril.* 2010; 94: 1320-1327.
11. Henningsen A.K., Pinborg A., Lidegaard Ø. i wsp.: Perinatal outcome of singleton siblings born after assisted reproductive technology and spontaneous conception: Danish national sibling-cohort study. *Fertil. Steril.* 2011; 95: 959-963.
12. Shih W., Rushford D.D., Bourne H. i wsp.: 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.
13. Bonduelle M., Liebaers I., Deketelaere V. i wsp.: 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.
14. 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.
15. Nangia A.K., Luke B., Abdel Megid W. i wsp.: National study of factors influencing assisted reproductive technology (ART) outcomes with male factor infertility. *Fertil. Steril.* 2010; 94: S33.
16. Olson C.K., Keppler-Noreuil K.M., Romitti P.A. i wsp.: In vitro fertilization is associated with an increase in major birth defects. *Fertil. Steril.* 2005; 84: 1308-1315.
17. Krieg S.A., Henne M.B., Westphal L.M.: Obstetric outcomes in donor oocyte pregnancies compared with advanced maternal age in in vitro fertilization pregnancies. *Fertil. Steril.* 2008; 90: 65-70.