

P R A C E K A Z U I S T Y C Z N E
położnictwo

Żywa ciąża bliźniacza otrzymana za pomocą metody ciągłego monitorowania zarodków u pacjentki z niepowodzeniami IVF-ET – opis przypadku i przegląd piśmiennictwa

An ongoing twin pregnancy after embryo time lapse monitoring in a patient with a history of IVF failures – case report and literature review

Paweł Radwan, Rafał Krasiński, Michał Radwan, Ireneusz Połac

Division of Reproductive Medicine, Gameta Hospital, Lodz, Poland.

Streszczenie

Wstęp: Standardowa obserwacja zarodków w procedurze IVF nie zawsze pozwala na wybór do transferu zarodka o najwyższym potencjale implantacyjnym. Naraża to pacjentkę na stres emocjonalny spowodowany brakiem ciąży, ewentualnym poronieniem oraz koniecznością powtórnego transferu zarodków mrożonych. W pracy przedstawiamy przypadek pacjentki po dwóch nieudanych próbach zapłodnienia pozaustrojowego *in vitro*, u której podczas kolejnego IVF-ICSI system *time-lapse* pomógł w wyborze dwóch prawidłowych zarodków. Zarodki przetransferowano w 3 dobie obserwacji i otrzymano żywą prawidłowo przebiegającą ciążę bliźniaczą.

Materiał i metody: Trzydziestopięcioletnia pacjentka z dwoma niepowodzeniami IVF-ICSI została zakwalifikowana do ponownej procedury IVF-ICSI. Wskazaniem do leczenia był czynnik męski. Po stymulacji jajników według protokołu długiego uzyskano 8 prawidłowych komórek MII, uzyskując 7 zarodków. Do ciągłego monitorowania rozwoju zarodków wykorzystano system *Primo Vision* (Cryo Innovation). 44 godziny po ICSI zidentyfikowano tylko dwa prawidłowo rozwijające się zarodki, które podano do jamy macicy w trzeciej dobie obserwacji. Pozostałe embriony nie wykazały cech dalszych podziałów. Czterdzieści dni po transferze w badaniu ultrasonograficznym uwidoczono ciążę bliźniaczą dwukosmówkową z czynnością serca obydwu płodów. Obecnie pacjentka jest w 27 tygodniu prawidłowo rozwijającej się ciąży bliźniaczej.

Wnioski: System ciągłego monitorowania rozwoju zarodków wprowadza nowe kryteria ich oceny, które mogą być przydatne w praktyce klinicznej. Konieczne są jednak prospektywne randomizowane badania oceniające wartość systemów *time-lapse* w leczeniu metodą zapłodnienia pozaustrojowego.

Słowa kluczowe: **ciągłe monitorowanie zarodków / morfologia /
/ zapłodnienie pozaustrojowe / podział komórki /**

Corresponding author:

Paweł Radwan
Division of Reproductive Medicine, Gameta Hospital, Lodz, Poland.
Rudzka 34/36, Rzgów 95-030, Poland
Tel + 48 606 725 720 Fax+ 48 42 645 76 00

Otrzymano: 12.08.2013
Zaakceptowano do druku: 30.10.2013

Paweł Radwan et al. Żywa ciąża bliźniacza otrzymana za pomocą metody ciągłego monitorowania zarodków u pacjentki z niepowodzeniami IVF-ET ...

Abstract

Introduction: A standard assessment of embryo morphology at given time points does not always allow to transfer the embryo with the highest implantation potential. The effect of transfer of an improper embryo results in a lack of pregnancy or a miscarriage and, as a consequence, exposes the patient to unnecessary emotional stress and necessity to perform yet another transfer of frozen embryos. We present a case of a patient with earlier IVF failures. The use of time-lapse technique in this case helped to choose two good embryos. The transfer resulted in ongoing twin pregnancy.

Material and methods: A 35-year-old woman with history of IVF-ET treatment failure was deemed eligible for an ICSI procedure because of the male factor. Ovarian stimulation was performed according to the agonist long protocol. Eight MII oocytes were fertilized and seven embryos were obtained. Continuous embryo monitoring was performed with the use of Primo Vision system. Forty-four hours after fertilization only 2 correctly developing embryos were identified. They were transferred on day 3. The development of the remaining 5 embryos was arrested. These embryos did not achieve the blastocyst stage on day 5-6 after fertilization. Forty days after embryo transfer, a twin pregnancy, confirmed with fetal heart rate of both fetuses, was revealed on ultrasound examination. Currently, the patient is at 27 weeks of ongoing twin gestation.

Conclusions: The system of continuous embryo monitoring introduces new criteria for the examination of embryo development. These new parameters can be useful in clinical practice. However, prospective randomized studies are necessary to provide data confirming the usefulness of time-lapse technique in IVF treatment.

Key words: **time-lapse monitoring / embryo selection / morphology / IVF / pregnancy / cell division /**

Wstęp

Spośród wszystkich metod leczenia niepłodności zapłodnienie pozaustrojowe (IVF) jest metodą najskuteczniejszą, stosowaną z powodzeniem w Polsce od 25 lat [1-4]. W 2008 roku w Europie wykonano 405091 cykli terapeutycznych IVF-ET. W krajach takich jak Dania co dwudzieste urodzone dziecko jest poczęte dzięki metodzie zapłodnienia pozaustrojowego [5]. Zjawisko nieprawidłowości wśród zarodków człowieka jest częste zarówno *in vivo* i *in vitro*. Nawet do 70% strat zarodków przypada na okres przedimplantacyjny [6, 7].

Standardowo w ośrodkach zajmujących się leczeniem niepłodności rutynowo ocenia się morfologię zarodków wyjmując je z inkubatora na jak najkrótszy okres czasu [8, 9]. Ten typ obserwacji jest wrywkowy i nie zawsze pozwala na wybór do transferu zarodka o najwyższym potencjale implantacyjnym. Naraża to pacjentkę na stres emocjonalny spowodowany brakiem ciąży, poronieniem oraz koniecznością podejścia do transferu zarodków mrożonych (FET – *frozen embryo transfer*). Pomocny w podjęciu właściwej decyzji o wyborze zarodka do transferu mógłby być system ciągłej jego obserwacji z możliwością zapamiętywania i późniejszej analizy obrazów z poszczególnych etapów rozwoju zarodka. Powyższa ocena morfokinetyki ułatwiłaby podjęcie decyzji o podaniu do macicy zarodka o największym potencjale rozwojowym [10, 11].

W pracy przedstawiamy przypadek 35-letniej pacjentki po wcześniejszych niepowodzeniach technik rozrodu wspomaganego, u której system *time-lapse* pomógł w wyborze dwóch prawidłowych zarodków. Transfer zarodków zaowocował żywą prawidłowo rozwijającą się ciążą bliźniaczą.

Materiał i metody

Pacjentka lat 35 zakwalifikowana do zapłodnienia pozaustrojowego z mikroiniekcją plemnika do komórki jajowej ze względu na nieprawidłowe parametry nasienia u partnera. W wywiadzie para miała za sobą cztery lata oczekiwania na ciążę, dwie nieudane próby zapłodnienia pozaustrojowego, w tym jedną w naszym ośrodku, podczas której przeniesiono pacjentce dwie blastocysty

w piątej dobie obserwacji uzyskując pojedynczą ciążę kliniczną z czynnością serca płodu. Niestety pacjentka samoistnie poroniła w 7 tygodniu ciąży. Podczas trzeciej próby zapłodnienia pozaustrojowego zastosowano tzw. protokół długi. Desensybilizację uzyskano podając codziennie agonistę GnRH w formie krótkodziałającej (0,1 mg Decapeptyl, Ferring Pharmaceuticals). Do stymulacji jajników użyto preparatu rekombinowanego FSH (Puregon, Organon) w dawce 150 IU 1x dziennie. Po 12 dniach stosowania preparatu rFSH zakończono stymulację podając rekombinowaną ludzką gonadotropinę kosmówkową (rHCG, Ovitrelle, Merck Serono).

Pobranie komórek jajowych wykonano po 36h od iniekcji rHCG, uzyskując 8 oocytów MII. Celem suplementacji fazy lutealnej zastosowano dopochwowo 3x 200 mg mikonizowanego progesteronu (Luteina, Adamed). Wykonano mikroiniekcję plemnika do 8 oocytów. Wszystkie komórki jajowe po mikroiniekcji oznaczone odpowiednio E1-E8 zostały umieszczone w szalce zawierającej 11 mikrokomór o średnicy 550µm i głębokości 170 µm (Wow dish, Cryo Innovation). Mikrokomory zawierały podłoże Global Total (Life Global), przykryte olejem LiteOil (Global IVF) (Rycina 1). Płytkę została przygotowana i umieszczona w inkubatorze 8 godzin przed pobraniem komórek jajowych.

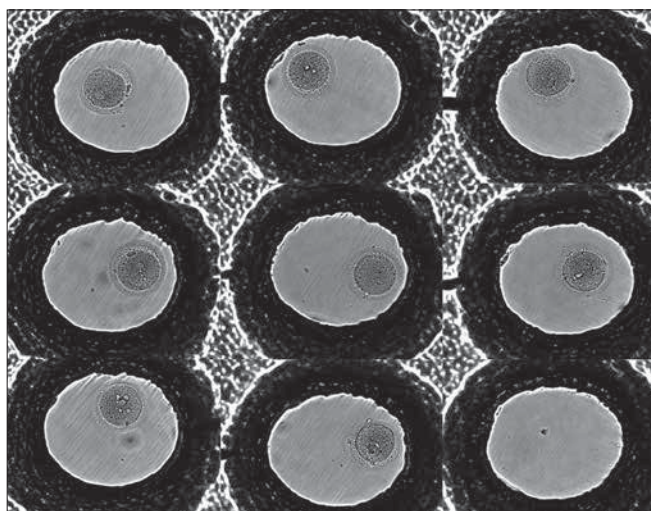
Do ciągłego monitorowania rozwoju zarodków wykorzystano system zbudowany z umieszczonego wewnątrz standardowego inkubatora odwróconego mikroskopu. Mikroskop wyposażono w cyfrową kamerę rejestrującą dynamikę rozwoju zarodków. Urządzenie podłączono do znajdującego się poza inkubatorem komputera, na którym zapisywano dane [10]. Kamera cyfrowa obejmowała obszar ok. 4 mm² zawierający wszystkie obserwowane zarodki (Rycina 1) i wykonywała zdjęcia co 10 minut. Ekran monitora HD wyświetlał aktualnie pobrane zdjęcie z inkubatora. Całkowite powiększenie na ekranie monitora wynosiło ok. 160x.

Nagrane zdjęcia były analizowane za pomocą programu dostarczonego przez producenta (Cryo Innovation). Ponadto embriolodzy posiadali ciągle dostęp *on-line* do zapisywanych obrazów drogą internetową.

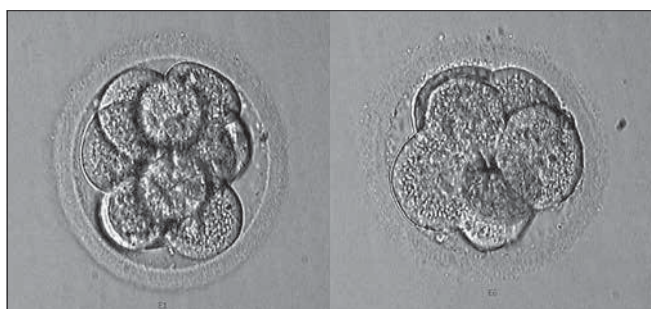
Tabela 1. Charakterystyka rozwoju otrzymanych zarodków wraz z poszczególnymi czasami podziałów.

Zarodki	T2 (h)	T3 (h)	T4 (h)	T5 (h)	Uwagi
E1	29,47	42,27	44,07	56,38	Prawidłowy rozwój (wolniejszy niż E6) – ciąża
E2	-	28,47	44,07	44,57	Podział bezpośredni na 3 blastomery (Rycina 4)
E3	22,57	38,27	53,18	55,28	W 39 h podział na 4 blastomery po czym resorpcja jednego blastomeru w 54h (Rycina 5)
E4	36,07	-	50,48	50,58	Późny pierwszy podział, krótka interfaza pomiędzy etapem 4 i 5 blastomerowym
E5	-	-	-	-	Brak zapłodnienia
E6	25,37	36,57	37,07	51,25	Prawidłowy rozwój – ciąża
E7	28,57	-	-	-	Różnica wielkości blastomerów na etapie dwukomórkowym, fragmentacja mniejszego blastomeru (Rycina 6)
E8	32,17	47,08	-	47,37	Późny pierwszy podział, krótka interfaza pomiędzy etapem 3 i 5 blastomerowym, nieuchwytny etap 4 blastomerowy

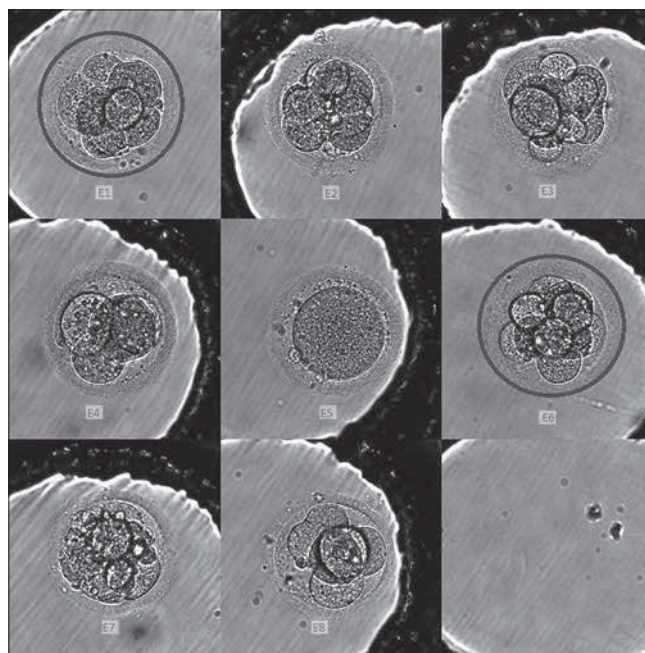
T2 – czas od mikroiniekcji do wytworzenia zarodka dwublastomerowego
T3 - czas od mikroiniekcji do wytworzenia zarodka trzyblastomerowego
T4 – czas od wykonania mikroiniekcji do wytworzenia zarodka czteroblastomerowego
T5 – czas od wykonania mikroiniekcji do wytworzenia zarodka pięcioblastomerowego



Rycina 1. Zygoty na etapie dwóch przedjądzy (Wow dish, Cryo Innovation).



Rycina 2. Zarodki E1 i E6 przed transferem do jamy macicy – obraz w tradycyjnym mikroskopie odwróconym.



Rycina 3. Zarodki w 3 dobie obserwacji – zaznaczone zarodki E1 i E6 zostały podane do jamy macicy.

Dla potrzeb analizy wyszczególniono czasy T1, T2, T3, T4 i T5 odpowiadające kolejno powstaniu zarodka dwu-, trzy, cztero i pięcioblastomerowego. W drugiej dobie obserwacji po analizie pobranych obrazów zdecydowano o wyborze dwóch zarodków E1 i E6 do transferu. (Rycina 2, Rycina 3).

Zarodki te rozwijały się prawidłowo, podziały następowały w czasach referencyjnych [12]. Zarodek E1 rozwijał się nieco wolniej od E6 aczkolwiek nie uwidoczniło żadnych patologii podczas podziału blastomerów. System pozwolił uwidocznić nieprawidłowości w pozostałych zarodkach, takie jak: nieprawidłowa cytokineza w zarodku E2 (Rycina 4), podział na 4 blastomery po czym resorpcja jednego blastomeru w zarodku E3 (Rycina 5), asymetria >25% na etapie dwukomórkowym w zarodku E7 (Rycina 6), późny pierwszy podział w zarodkach E4 i E8 oraz nieuchwytny etap czteroblastomerowy w embrionie E8. (Tabela 1). Zarodki E2, E3, E4, E7 i E8 nie rozwinęły się do stadium blastocysty.

Paweł Radwan et al. Żywa ciąża bliźniacza otrzymana za pomocą metody ciągłego monitorowania zarodków u pacjentki z niepowodzeniami IVF-ET ...

Czterdzieści dni po transferze zdiagnozowano ciążę bliźniaczą dwukosmówkową z czynnością serca obydwu płodów. Do chwili obecnej (27 tydzień) ciąża przebiega prawidłowo.

Dyskusja

Technika *time-lapse* pozwala uwidocznić i dostrzec procesy, które normalnie zachodzą z dużo mniejszą dynamiką. Zjawiska opisane dzięki technice *time-lapse* byłyby niemożliwe do uwidocznienia przez oko embriologa podczas tradycyjnej obserwacji. Dynamiczna analiza rozwoju zarodków dokumentuje przebieg poszczególnych podziałów komórkowych, dając możliwość wyboru najlepszych zarodków do transferu. Ponadto zarodki nie muszą być wyjmowane z inkubatora co nie naraża ich na zmiany środowiska przede wszystkim pH i temperatury. Sam proces pobierania danych jest bezpieczny. Natężenie oświetlenia użyte podczas fotografowania zarodków jest wielokrotnie niższe ($6\mu\text{W}/\text{cm}^2$) niż podczas standardowej oceny pod mikroskopem odwróconym ($80\text{-}90\text{ mW}/\text{cm}^2$) [10].

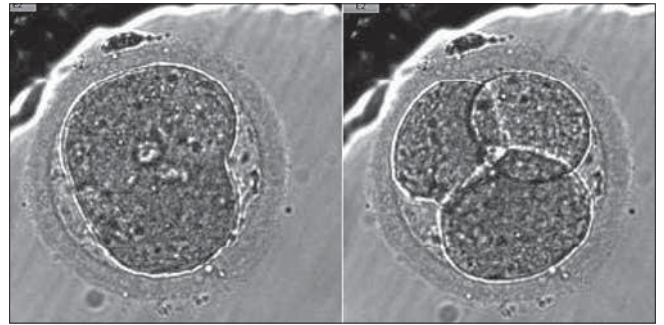
Zatrzymanie rozwoju zarodka może nastąpić w każdym momencie rozwoju zarówno przed implantacją jak i już po niej. Jest to spowodowane przede wszystkim aneuploidiami, poliploidiami i mozaicyzmem zarodków [6-8]. Fakt mozaicyzmu zarodków, inwazyjność, oraz ryzyko uszkodzenia zarodka powoduje, że przedimplantacyjny genetyczny skrining zarodków (PGS, Preimplantation Genetic Screening) nie zwiększa szansy na urodzenie dziecka po IVF. Dlatego też na obecnym etapie wiedzy nie zaleca się rutynowo stosowania PGS jako alternatywy dla nieinwazyjnych metod oceny zarodków [13].

Inną nieinwazyjną metodą oceny zarodków jest pomiar metabolizmu zarodka poprzez analizę substancji pobieranych i wydzielanych przez embriion do otaczającego środowiska. Postuluje się, że wykrywanie ich w podłożu otaczającym zarodek może z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, który zarodek rozwinię się do stadium blastocysty i implantuje [14]. Niestety pomimo kilku ciekawych badań analiza profilu metabolicznego zarodka czyli tzw. metabolomika nie znalazła zastosowania w codziennej praktyce [15, 16].

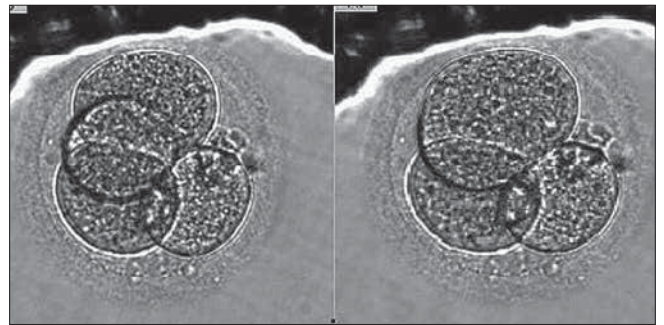
Co ciekawe w opisywanym przypadku system ciągłego monitorowania zarodków pozwolił na wybór prawidłowych embriionów, z których uzyskano żywą ciążę bliźniaczą już po 44 godzinach ciągłej obserwacji. Tylko dwa wybrane embriiony prezentowały prawidłowy rozwój i zostały przeniesione do jamy macicy. Pozostałe embriiony wykazały cechy niepożądane podczas analizy, czego skutkiem był brak ich dalszego rozwoju do stadium blastocysty. System umożliwił nie tylko ocenę dynamiki podziału, ale też retrospektywną ocenę morfologii zarodków ukazując takie zjawiska, jak: nieprawidłowa cytokineza, asynchronizm podziału blastomerów, resorpcję blastomerów i fragmentację cytoplazmy (Tabela I).

Nieprawidłowy zarodek E2 musiał być odrzucony już na etapie pierwszego podziału w 29 godzinie. Zygota (E2) podzieliła się nieprawidłowo, bezpośrednio na 3 blastomery (Rycina 4).

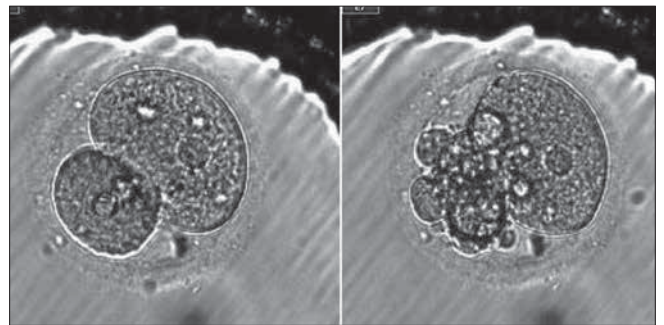
W sytuacji zarodka E4 zapłodniona komórka jajowa (E4) wykonała podział na dwa blastomery za późno – dopiero w 37 godzinie od zapłodnienia. E7 stał się zarodkiem dwu-blastomerowym w 29 godzinie aczkolwiek stwierdzono w nim asymetrię blastomerów i patologiczną fragmentację mniejszego blastomeru. Embriion E8 dopiero w 33 godzinie był zarodkiem dwu-blastomerowym. Nieprawidłowy zarodek E3 nie wykazał cech nie-



Rycina 4. Podział bezpośredni na 3 blastomery – nieprawidłowa cytokineza (zarodek E2).



Rycina 5. Podział na 4 blastomery i resorpcja jednego blastomeru (zarodek E3).



Rycina 6. Asymetria na etapie dwukomórkowym, fragmentacja mniejszego blastomeru (E7).

pożądanych aż do 43 godziny, kiedy to na etapie cztero-blastomerowym błędnie doszło do resorpcji jednego blastomeru. Stabilny etap 4-komórkowy osiągnął ponownie dopiero w 54 godzinie.

Postuluje się, że prawidłowy czas cytokinezy oraz czas utworzenia trzech i czterech blastomerów koreluje z szansą uzyskania ciąży [17]. Lemmen i wsp. nie wykazali istotnej korelacji pomiędzy prawidłowym czasem pierwszego podziału a ciążą wskazując jedynie korelację z prawdopodobieństwem otrzymania blastocysty [18].

Jednak ostatnie badanie Meseguera i wsp. na stosunkowo dużej grupie zarodków ($n=247$) pochodzących od dawczyń komórek jajowych wykazało dodatnią korelację pomiędzy prawidłowym czasem podziału pierwszego zarodka a szansą na uzyskanie ciąży. Autorom udało się zidentyfikować sześć parametrów, które korelują z implantacją zarodka. Były to: czas powstania 5 blastomerów (48-56,6 godziny), okres pomiędzy podziałem zarodka

Paweł Radwan et al. Żywa ciąża bliźniacza otrzymana za pomocą metody ciągłego monitorowania zarodków u pacjentki z niepowodzeniami IVF-ET ...

trzy-blastomerowego na zarodek cztero-blastomerowy (<0,76 godziny), okres pomiędzy podziałem zarodka dwu-blastomerowego na trzy-blastomerowy (<11,9 godziny) [12].

Ciąża wielopłodowa jest związana ze zwiększonym ryzykiem powikłań w porównaniu z ciążą pojedynczą [19, 20, 21]. W większości klinik w czasie procedury IVF podaje się pacjentce dwa zarodki podnosząc ryzyko ciąży bliźniaczej. Być może stosując system *time-lapse* u części pacjentek można by ograniczyć zjawisko ciąży bliźniaczych podając jeden embriion przy jednoczesnym zachowaniu dużego prawdopodobieństwa uzyskania ciąży. System ma jeszcze jedną zaletę – pozwala na ciągłą obserwację zarodków *on line* nie tylko zespołowi kliniki, ale również pacjentom, co może mieć wpływ na lepszą współpracę pacjenta, embriologa i lekarza klinicysty w procesie leczenia.

Wnioski

System ciągłego monitorowania zarodków jest nowoczesną i ciekawą techniką. Metoda ta wprowadza nowe kryteria, które mogą przyspieszyć i pomóc w wyborze odpowiedniego zarodka do transferu. Konieczne są jednak prospektywne randomizowane badania oceniające przydatność ciągłego monitorowania zarodków w codziennej praktyce klinicznej.

Oświadczenie autorów

1. Paweł Radwan – autor koncepcji i założeń pracy, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Rafał Krasieński – zebranie materiału, analiza wyników.
3. Michał Radwan – współautor tekstu pracy, korekta i aktualizacja literatury.
4. Ireneusz Połać – przygotowanie, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.

Źródło finansowania: Praca nie była finansowana przez żadną instytucję naukowo-badawczą, stowarzyszenie ani inny podmiot, autorzy nie otrzymali żadnego grantu.

Konflikt interesów: Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Szamatowicz M, Kulikowski M, Kuczyński, [et al.]. The in vitro fertilization program in Białystok, Poland. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1988, 5, 307-308.
2. Sipak-Szmigiel O, Cybulski C, Wokolorczyk, [et al.]. HLA-G polymorphism and in vitro fertilization failure in a Polish population. *Tissue Antigens.* 2009, 73, 348-352.
3. Vlaisavljevic, Meden-Vrovec H, Lewandowski P, [et al.]. An observational study of assisted reproductive technology outcomes in new European Union member states: an overview of protocols used for ovarian stimulation. *Curr Med Res Opin.* 2010, 82, 378-381.
4. Fulmańska M, Radowicka M, Radwan M, [et al.]. [Pregnancy of a 47-year old woman treated by in vitro fertilization using oocyte from a donor (IVF-OD)]. *Ginekol Pol.* 2011, 82, 378-381.
5. Ferraretti AP, Goossens V, de Mouzon J, [et al.]. Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2012.
6. Munné S, Chen S, Colls P, [et al.]. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online.* 2007, 14, 628-634.
7. Radwan M. Clinical applications and procedures of human in vitro fertilization. *Acta Biologica Cracoviensis Series Botanica.* 2004, 46, 1.

8. Baczkowski T, Kurzawa R, Głabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol.* 2004, 4, 5-22.
9. Medicine ASIR, Embryology ESIG. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online.* 2011, 22, 632-646.
10. Pribenszky C, Losonczy E, Molnár M, [et al.]. Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reprod Biomed Online.* 2010, 20, 371-379.
11. Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, [et al.]. Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. *PLoS One.* 2012, 7, e36627.
12. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, [et al.]. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011, 26, 2658-2671.
13. Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, [et al.]. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update.* 2011, 17, 454-466.
14. Seil E, Vergouw CG, Morita H, [et al.]. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril.* 2010, 94, 535-542.
15. Nel-Themaat L, Nagy ZP. A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta.* 2011; 32, Suppl 3, S257-263.
16. Vergouw CG, Kieslinger DC, Kosteljik EH, [et al.]. Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2012, 27, 2304-2311.
17. Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod.* 2012, 27, 1277-1285.
18. Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2008, 17, 385-391.
19. Szymanski S, Malinowski W, Ronin-Walkowska E. Type of afterbirth and twin birth weight discordance. *Med Wieku Rozwoj.* 2010, 14, 378-373. In Polish
20. Szymusik I, Kosinska-Kaczynska K, Bomba-Opon D, [et al.]. IVF versus spontaneous twin pregnancies - which are at higher risk of complications. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012, 25, 2725-2728.
21. Szymborska T, Kaminski K, Niemiec KT, [et al.]. Perinatal outcome analysis of twin pregnancies at the Department of Obstetrics and Gynecology Central Clinical Hospital of Ministry of Inferior and Administration in Warsaw in the years 2005-2006. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007;45, 149-151.