

HIỆU QUẢ CỦA ĐÁNH GIÁ PHÔI Ở GIAI ĐOẠN PHÔI BÀO PHÂN CHIA ĐẦU TIÊN

Nguyễn Ngọc Quỳnh⁽¹⁾, Bùi Thị Thu Hiền⁽¹⁾, Trần Tú Cẩm⁽¹⁾, Đặng Quang Vinh^(1,2)

(1) Bệnh viện Vạn Hạnh, IVF/VH

(2) Trung tâm Nghiên cứu Di truyền & Sức khỏe Sinh sản, Khoa Y - ĐHQG-HCM

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá hiệu quả của việc chọn lựa phôi chuyển thông qua đánh giá phôi phân chia giai đoạn sớm trên tỷ lệ thai lâm sàng ở những bệnh nhân TTTON.

Phương pháp thực hiện: Đây là nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng không nhóm chứng. Vào thời điểm 25 – 27 giờ sau ICSI, tiến hành kiểm tra sự hiện diện của phôi 2 tế bào. Phân nhóm EC (có sự hiện diện của phôi 2 tế bào) và nhóm NEC (không có sự hiện diện của phôi 2 tế bào). Kiểm tra phôi ngày 2 (42 – 44 giờ) và chuyển phôi ở thời điểm 46 giờ sau ICSI. Chất lượng phôi chuyển dựa trên hình thái phôi đồng thời ưu tiên chọn những phôi có sự hiện diện phôi 2 tế bào ở thời điểm 25 – 27 giờ sau ICSI.

Kết quả: Nghiên cứu được thực hiện trên 644 chu kỳ, có 480 chu kỳ được xếp vào nhóm EC – có ít nhất hiện diện một phôi 2 tế bào (74,5%). Tỷ lệ β -hCG nhóm chuyển phôi có EC (42,1%) cao hơn 1,5 lần so với nhóm NEC (28,9%), trong khi tỷ lệ thai lâm sàng nhóm EC cao hơn so với nhóm NEC (35,4% và 22,8%) và tỷ lệ làm tổ của phôi EC cao hơn NEC (15,7% và 9,7%).

Kết luận: Đánh giá sự hiện diện của phôi 2 tế bào ở thời điểm từ 25 – 27 giờ sau ICSI là một phương pháp hiệu quả và có giá trị cho việc đánh giá khả năng sống của phôi sau chuyển phôi, làm tăng tỷ lệ thai lâm sàng.

ABSTRACT

EFFECTIVE OF EARLY CLEAVAGE FOR PREDICTING SUCCESSFUL IN ICSI OUTCOME

Objective: to evaluate effective for selecting the best embryos and reduce the twin

pregnancy rate, we compared the pregnancy outcome in two subgroups of ICSI patients, using early division (25 - 27h post injection) to the 2-cell stage as a criterion for embryo quality and viability (ability to produce a pregnancy).

Methods: Early cleavage to the 2-cell stage was determined 25–27 h after injection. Fertilized embryos that had cleaved to the 2-cell stage 25 h post- insemination were designated as ‘early cleavage’ embryos while the others that had not yet reached the 2-cell stage were designated as ‘no early cleavage’. In all cases the early cleavage embryos were transferred when available.

Results: Early cleavage was observed in 480 (74.5%) of the 644 cycles. A significantly higher pregnancy rate and implantation rate were observed after transfer of EC embryos compared to non-EC embryos (pregnancy rate: 42.1% versus 28.9%; implantation rate: 15.7% versus 9.7%).

Conclusions: In order to improve the selection of the embryo with the highest implantation potential, selection for transfer should not be based on cell number and morphology on the day of transfer alone, but also on early cleavage status.

TỔNG QUAN

Điều trị vô sinh bằng phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) đã được sử dụng rộng rãi trong hơn 20 năm qua ở các trung tâm trên thế giới. Ngày nay, với phác đồ kích thích buồng trứng và hệ thống nuôi cấy phôi ngày càng phát triển giúp nâng cao số lượng cũng như về chất lượng phôi, do đó hiệu quả của việc điều trị đã tăng lên đáng kể từ những chu kỳ đầu tiên. Tuy nhiên, tỷ lệ làm tổ của phôi

vẫn còn tương đối thấp khoảng 30%^[1]. Nhằm nâng cao tỷ lệ thai, số lượng phôi chuyển trung bình dao động từ 3 – 4 phôi. Dẫn đến nguy cơ đa thai cao, đây là mối nguy hại cho cả mẹ và bé. Để giảm thiểu tối đa nguy cơ đa thai, các nghiên cứu nhằm giảm số lượng phôi chuyển đang được hướng đến.

Để đảm bảo ổn định tỷ lệ thai lâm sàng đồng thời hạn chế tối đa tỷ lệ đa thai, phôi chuyển cần phải được lựa chọn dựa trên những tiêu chuẩn đánh giá nghiêm ngặt. Hiện nay hệ thống đánh giá phôi chủ yếu dựa trên hình thái và tốc độ phát triển của phôi vào ngày chuyển phôi. Tốc độ phát triển của phôi đặc trưng bởi số phôi bào, hình thái phôi được đánh giá dựa theo kích thước phôi bào, sự hiện diện và phân bố các mảnh vụn tế bào, sự hiện diện của phôi bào đơn nhân, đa nhân. Bên cạnh đó, một số trung tâm đang áp dụng các chỉ số khác như đánh giá hình thái noãn, hình thái hợp tử^[2], đánh giá phôi ở giai đoạn phân chia đầu tiên^[3,4] hoặc nuôi cấy phôi đến giai đoạn phôi nang.

Thông thường, đa số các trung tâm thực hiện chuyển phôi thường quy vào giai đoạn phôi ngày 2 / ngày 3. Chuyển phôi ở giai đoạn phôi phân sớm đòi hỏi phải có định nghĩa về phôi tối ưu rõ ràng, chính xác. Để có thể xác định phôi tối ưu, các đặc điểm hình thái phải được đánh giá trong suốt quá trình phát triển. Vào năm 1997, báo cáo đầu tiên nhận định rằng thời gian phôi phân chia lần đầu tiên có thể được sử dụng để tiên đoán khả năng phát triển của phôi và khả năng làm tổ của phôi^[3]. Sau đó, một loạt các báo cáo khoa học của nhiều nhà khoa học khác cũng cho những kết quả tương tự^[5,6,7,8].

Mối quan hệ mật thiết giữa thời gian phân chia ở giai đoạn phân chia đầu tiên với tiềm năng phát triển của phôi đã được nghiên cứu từ các loài khác nhau từ những năm 1973. Thời gian hợp tử bắt đầu lần phân chia đầu tiên thông thường khoảng 24 giờ sau thụ tinh. Sự phân bào này không kèm theo sự tăng trưởng của tế bào, vì thế ở những lần phân bào tiếp theo sẽ làm cho

hợp tử ban đầu trở thành nhiều tế bào con được gọi là phôi bào. Trong lúc này phôi như một khối tế bào chưa có sự thay đổi về kích thước và vẫn còn được màng trong suốt bao bọc phía ngoài.

Hầu hết các phôi thường bước vào giai đoạn M trong khoảng 27 - 30 giờ sau khi tinh trùng xâm nhập vào noãn^[9]. Phôi phân chia sớm (early cleavage – EC) là phôi bước vào giai đoạn M vào khoảng 17 – 22 giờ sau khi tinh trùng xâm nhập vào noãn và hoàn tất giai đoạn M hình thành 2 tế bào khoảng 20 – 25 giờ^[9]. Ngược lại, những phôi phân chia chậm hơn (non early cleavage – NEC) sẽ bước vào giai đoạn M vào khoảng 30 – 31 giờ sau khi tinh trùng xâm nhập vào noãn và hình thành 2 tế bào vào khoảng 33 – 34 giờ.

Một số nghiên cứu cho thấy khoảng thời gian kiểm tra phôi EC có thể là khoảng 22 – 25 giờ hoặc 25 – 27 giờ hoặc 27 – 29 giờ sau thụ tinh. Hầu hết các nghiên cứu đều cho rằng khoảng 25 – 27 giờ sau thụ tinh là thời điểm thích hợp nhất cho việc đánh giá phôi phân chia sớm^[10,11,12,11].

Trong nghiên cứu của Meseguer và cộng sự (2010) phân tích trên tỷ lệ làm tổ theo thời gian đánh giá EC cho thấy khi đánh giá giai đoạn phân chia đầu tiên của phôi ở thời gian sớm hơn hay trễ hơn khoảng thời gian từ 25 – 27 giờ sau khi tinh trùng xâm nhập vào noãn đều cho tỷ lệ làm tổ thấp hơn và tỷ lệ thất bại làm tổ cao hơn^[13].

Bài nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá hiệu quả của đánh giá phôi ở giai đoạn phân chia đầu tiên ở khoảng thời gian 25 – 27 giờ sau khi tinh trùng xâm nhập giúp cho việc chọn các phôi có tiềm năng phát triển và làm tổ, mang lại hiệu quả cao.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đây là nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng không nhóm chứng, được thực hiện trong thời gian từ tháng 3/2012 đến tháng 12/2012 tại IVF Vạn Hạnh. Tổng cộng có 644 bệnh nhân có chỉ định ICSI. Tiêu chuẩn nhận là bệnh

nhân dưới 45 tuổi, chỉ số khối cơ thể BMI bình thường và các xét nghiệm nội tiết trong giới hạn bình thường, và thực hiện chuyển phôi ngày 2. Các trường hợp chuyển phôi ngày 3 hoặc chuyển phôi ngày 5 đều không được nhận vào nghiên cứu.

Bệnh nhân sau khi kích thích buồng trứng được tiến hành chọc hút sau 34 – 36 giờ tiêm hCG dưới sự hướng dẫn của siêu âm đầu dò âm đạo. Noãn sau khi chọc hút được nuôi trong tủ cấy CO₂ trong khoảng 2 – 3 giờ trước khi được tách bỏ lớp tế bào xung quanh. Noãn của tất cả bệnh nhân trong nghiên cứu được thụ tinh bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI). Noãn sau khi ICSI được chuyển vào môi trường ISM1 (Origio, Đan Mạch) và được nuôi qua đêm trong tủ cấy với CO₂ 6%. Vào thời điểm kiểm tra thụ tinh, sau 16 – 18 giờ sau ICSI, noãn được đánh giá sự hiện diện 2PN, phân nhóm 2PN và 1 tế bào. Vào thời điểm 25 – 27 giờ sau ICSI, tiến hành kiểm tra sự hiện diện của phôi 2 tế bào. Phân nhóm EC (có sự hiện diện của phôi 2 tế bào) và nhóm NEC (không có sự hiện diện của phôi 2 tế bào). Kiểm tra phôi ngày 2 (42 – 44 giờ) và tiến hành chuyển phôi ở thời điểm 46 giờ sau ICSI. Số lượng phôi chuyển trung bình 4 phôi, chất lượng phôi chuyển dựa trên hình thái

phôi như số lượng phôi bào, độ đồng đều, độ phân mảnh của phôi bào, đồng thời ưu tiên chọn những phôi có sự hiện diện phôi 2 tế bào ở thời điểm 25 – 27 giờ sau ICSI. Chuyển phôi được thực hiện với catheter đầu mềm dưới hướng dẫn của siêu âm ngả bụng. Bệnh nhân được hỗ trợ hoàng thể tương tự như các chu kỳ chuyển phôi khác và thử máu (βhCG) sau 14 ngày chuyển phôi. Nếu dương tính, bệnh nhân được siêu âm vào 3 tuần sau đó.

Yếu tố đánh giá kết quả bao gồm tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ phôi ngày 2, tỷ lệ phôi tốt ngày 2, tỷ lệ thai lâm sàng và tỷ lệ làm tổ của phôi.

Số liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS 19.1. One way ANOVA test và compare mean được sử dụng để so sánh số liệu của 2 nhóm, p<0,05 được xem là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

KẾT QUẢ

Trong thời gian nghiên cứu, chúng tôi tiến hành trên 644 chu kỳ, có 480 chu kỳ được xếp vào nhóm EC – có ít nhất hiện diện một phôi 2 tế bào (74,5%). Kết quả cho thấy không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê về đặc điểm nguồn bệnh cũng như về đặc điểm đầu vào (số trứng chọc hút, số trứng ICSI, tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ phôi) giữa 2 nhóm EC và NEC (Bảng 1).

Bảng 1: Đặc điểm bệnh nhân ở 2 nhóm EC và NEC

	EC	NEC	P
Số chu kỳ	480	164	
Số tuổi trung bình	34.0 ± 5.0	33.7 ± 4.9	NS
NMTC	10.4 ± 2.7	10.6 ± 2.6	NS
Tổng số noãn CH	11.8 ± 6.3	8.3 ± 5.8	NS
Tổng số noãn MII	9.9 ± 5.6	6.5 ± 5.1	NS
Tỷ lệ thụ tinh	75.2%	74.6%	NS
Tỷ lệ phôi	72.3%	69.4%	NS

Trong 644 chu kỳ thực hiện, có 451 ca tử thai (nhóm EC có 337 ca; nhóm NEC có 114 ca), 143 ca trữ phôi toàn bộ, 10 ca không có phôi để chuyển, và 10 ca không liên lạc được với bệnh nhân.

Ở bảng 2 cho thấy tỷ lệ làm tổ cũng như tỷ lệ thai lâm sàng ở những bệnh nhân có ít nhất 1 phôi phân chia ở giai đoạn sớm (EC) so với nhóm không có sự hiện diện của phôi phân chia giai đoạn sớm (NEC). Mặc dù không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê về tỷ lệ phôi hình thành, nhưng nhóm EC có tỷ lệ phôi tốt ngày 2 cao hơn mang ý nghĩa thống kê so với nhóm NEC (60% và 39,2%; $p < 0,001$). Tỷ lệ β hCG nhóm chuyển phôi có EC (42,1%) cao hơn 1,5 lần so với nhóm NEC (28,9%) trong khi tỷ lệ thai lâm sàng nhóm EC cao hơn so với nhóm NEC (35,4% / 22,8%).

Bảng 2: Đặc điểm bệnh nhân ở 2 nhóm EC và NEC

	EC	NEC	P
Tỷ lệ phôi tốt	60%	39.2%	< 0.001
Số phôi chuyển	2.3 ± 1.6	2.0 ± 1.5	NS
Tỷ lệ β -hCG	42.1%	28.9%	< 0.05
Tỷ lệ thai lâm sàng	35.4%	22.8%	< 0.05
Tỷ lệ làm tổ của phôi	15.7%	9.7%	< 0.05

Ở bảng 3 thể hiện tỷ lệ thai lâm sàng, tỷ lệ đa thai giữa các nhóm bệnh nhân có số lượng phôi EC chuyển khác nhau. Có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa các nhóm phôi chuyển có từ 1EC đến 4EC khi so sánh về tỷ lệ β hCG cũng như tỷ lệ thai lâm sàng và tỷ lệ đa thai. Kết quả cho thấy ở nhóm chuyển 3EC, tỷ lệ β hCG đạt 53,5%; tỷ lệ thai lâm sàng (41,9%) cao hơn so với các nhóm còn lại.

Bảng 3: Kết quả điều trị giữa các nhóm có phôi EC được chuyển phôi

	1EC (n = 106)	2EC (n = 67)	3EC (n = 43)	4EC (n = 30)	P
Tỷ lệ β hCG	34,8%	43,3%	53,5%	50%	< 0,05
Tỷ lệ thai lâm sàng	28,3%	37,3%	41,9%	36,7%	< 0,05
Tỷ lệ làm tổ	89%	12,8%	14,5%	9,8%	NS
Tỷ lệ đa thai	9,5%	20,8%	12,55	18,2%	< 0,05

BÀN LUẬN

Chọn lựa phôi chuyển thông thường phụ thuộc vào hình thái phôi vào thời điểm chuyển phôi. Bên cạnh dựa vào hình thái phôi. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy hiệu quả của các phương pháp đánh giá như đánh giá tiền nhân hay đánh giá ở giai đoạn phân chia đầu tiên trong chọn lựa phôi chuyển nhằm tăng tỷ lệ thai.

Nhiều nhà nghiên cứu đã đề xuất đánh giá phôi ở giai đoạn tiền nhân có khả năng chọn lựa những phôi có tỷ lệ làm tổ cao hơn. Đánh giá tiền nhân dựa trên hình thái tiền nhân của hợp tử được thụ tinh bao gồm số lượng và sự phân bố của các hạt nhân trong mỗi tiền nhân. Sự định hướng của tiền nhân liên quan đến thể cực, sự thẳng hàng giữa tiền nhân và hạt nhân, sự xuất hiện của tế bào chất, sự hòa màng của hạt nhân và sự phân chia ở giai đoạn sớm tạo thành 2 tế bào. Scott và cộng sự (2000) đã cho thấy rằng đối với hợp tử có sự phân bố hạt nhân đồng đều thì có khả năng hình thành phôi nang đến 49,5%, ngược lại đối với những hợp tử có sự phân bố hạt nhân không đồng đều thì chỉ có 28% đạt được đến giai đoạn phôi nang^[14].

Đồng thời các nghiên cứu cũng cho thấy những phôi có sự phân chia sớm ở giai đoạn phôi 2 tế bào đã được báo cáo là có khả năng hình thành phôi nang cao hơn và có khả năng làm tổ cao hơn. Báo cáo của Laetitia và cộng sự (2008) trên 201 chu kỳ chuyển phôi cho thấy những phôi EC có chất lượng phôi ngày 2 tốt hơn những phôi NEC (55,4% và 37,6%)^[4]. Với các ưu điểm của phôi EC, các trung tâm IVF đã tiến hành kiểm tra, đánh giá giai đoạn phôi phân chia đầu tiên trong quy trình chọn lựa phôi chuyển. Kết quả tổng kết của Fanscovits và cs (2006) cho thấy rằng tỷ lệ thai lâm sàng, tỷ lệ làm tổ của phôi của nhóm bệnh nhân chuyển phôi EC cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm bệnh nhân chuyển phôi NEC (48,3% và 27,3%)^[1].

Nhằm nghiên cứu khả năng phát triển và làm tổ của các phôi EC, Samulets và cộng sự (2003) đã thực hiện 178 chu kỳ chuyển đơn phôi. Kết quả

tỷ lệ thai hầu như tăng gấp đôi (50% và 26,4%, $p = 0,001$)^[10]. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Van Montfoort và cộng sự (2004) tỷ lệ thai khi chuyển 1 phôi EC cao hơn đáng kể so với chuyển 1 phôi NEC (46,4% và 17,6%, $p < 0,001$). Tuy nhiên, kết quả chuyển 2 phôi EC cũng cho kết quả tương tự như khi chuyển 1 phôi (45% và 46,4%)^[15]. Kết quả này tương tự như báo cáo của Fu và cộng sự (2009), cho thấy số phôi chuyển và tỷ lệ đa thai có mối liên hệ với nhau, tỷ lệ đa thai tăng dần theo số lượng phôi chuyển^[16].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, chúng tôi sử dụng phân tích phôi hiện diện 2 tế bào ở thời điểm 25 – 27 giờ sau ICSI là thời điểm quan trọng để lựa chọn phôi để chuyển. Tỷ lệ thai lâm sàng và tỷ lệ làm tổ tăng lên đáng kể khi chuyển những phôi thuộc nhóm phôi EC (35,4% và 15,7%). Kết quả này cũng tương tự các bài báo cáo của các tác giả trong các nghiên cứu trước đó về tính ưu thế của phôi EC^[3,5].

Trong nghiên cứu này chúng tôi thấy rằng sự hiện diện phôi ở giai đoạn sớm là do bản thân nội tại của noãn bào hoặc do bản thân của phôi của từng bệnh nhân. Tuy nhiên có thể có mối liên quan đến thời gian chọc hút trứng hoặc thời điểm tiêm hCG, hoặc thời gian tiêm ICSI. Chúng tôi cũng đồng ý rằng chọn lựa phôi chuyển dựa trên hình thái phôi và thời điểm đánh giá phôi phân chia giai đoạn sớm thì hiệu quả hơn so với chọn lựa phôi chuyển chỉ dựa vào hình thái phôi vào ngày chuyển phôi. Đồng thời tỷ lệ thai lâm sàng, tỷ lệ đa thai giữa các nhóm bệnh nhân có số lượng phôi EC chuyển khác nhau. Tương tự như các nghiên cứu trước đây của các tác giả^[17,18] cho thấy tỷ lệ thai lâm sàng tăng dần theo số lượng phôi chuyển. Có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ở nhóm chuyển 1EC và nhóm chuyển trên 1EC khi so sánh về tỷ lệ thai lâm sàng cũng như tỷ lệ làm tổ của phôi và tỷ lệ đa thai.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã cho thấy khi đánh giá sự hiện diện của phôi 2 tế bào ở

thời điểm từ 25 – 27 giờ sau ICSI là một phương pháp hiệu quả và có giá trị cho việc đánh giá khả năng sống của phôi sau chuyển phôi, ở chỗ nó cung cấp một dấu hiệu tiên lượng mạnh mẽ của khả năng mang thai.

Với kết quả ghi nhận được như trên, để đảm bảo tỷ lệ thai lâm sàng nhưng vẫn hạn chế được tỷ lệ đa thai, trung tâm chúng tôi hiện nay đang tiến hành triển khai chuyển 2 – 3 phôi EC trên từng ca.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fancsovits P, Takacs FZ, Tothne GZ, Papp Z, Urbancsek J (2006). Examination of Early Cleavage and its importance in IVF treatment. *J. Reproduktionsmed. Endokrinol*; 3(6): 367-372.
2. Baczowski T, Kurzawa R, Głabowski W (2004). Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reproductive Biology*; 4: 5-22.
3. Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D (1997). Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod*; 12: 1531-1536.
4. Hesters L, Prisant N, Fanchin R, Mendez Lozano RH, Feyereisen E, Frydman R, Tachjian G, Frydman N (2008). Impact of early cleaved zygote morphology on embryo development and in vitro fertilization–embryo transfer outcome: a prospective study. *Fertility and Sterility*; 89 (6): 1677-1684.
5. Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG, Campana A (1998). Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod*; 13:182-187.
6. Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN (2001). Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Human Reprod*; 16: 2658-2661.
7. Lundin K, Bergh C, Hardarson T (2001). Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Human Reprod*; 16: 2652–2657.
8. Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M (2002). Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Human Reprod*; 17: 407-412.
9. Plachot M (2000). Fertilization. *Hum Reprod*; 15(Suppl 4): 19–30.
10. Salumets A, Hayden-Granskog C, Makinen S, Suikkari AM, Tiittinen A, Tuuri T (2003). Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective embryos transfer procedures. *Hum Reprod*; 18: 821-825.
11. Wharf E, Dimitrakopoulos A, Khalaf Y, Pickering S (2004). Early embryo development is an indicator of implantation potential. *Reprod BioMed Online*; 2: 212-218.
12. Windt ML, Kruger TF, Coetzee K, Lombard CJ (2004). Comparative analysis of pregnancy rates after the transfer of early dividing embryos versus slower dividing embryos. *Human Reprod*; 19: 1155-1162.
13. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, de los Santos MJ, Escrich L, Garrido N, Ramsing N (2010). Embryos with too early first cleavage fail to implant, correlation between exact timing of first cleavage and successful implantation. The 26th Annual Meeting of ESHRE, Rome, Italy.
14. Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B (2000). The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod*; 15: 2394–403.
15. Van Montfoort APA, Dumoulin JCK, Kester ADM, Evers JLH (2004). Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Human Reprod*; 19: 2103-2108.
16. Fu J, Wang XJ, Wang YW, Sun J, Gemzell – Danielsson K, Sun XX (2009). The influence of early cleavage on embryo developmental potential and IVF/ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet*; 26:437-441.
17. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN (1997). Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryo for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*; 12: 1545-1549.
18. Wittemer C, Bettarhar – Lebugle K, Ohl J, Rongieres C, Nisand I, Gerlinger P (2000). Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod*; 15: 2591-2597.