بررسی اثر زوناهچینگ در افزایش میزان باروری در جنین های دارای زونای ضخیم توسط اشعه لیزر

اعظم سادات امینی[1*]، دکتر جواد بهارآرا[2]، دکتر نیره خادم[3]، دکتر محسن جلالی[4]

۱. کارشناسی ارشد جنین شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، مشهد، ایران.
۲. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، مشهد، ایران.
۳. دانشیار گروه زنان و مامایی، مرکز تحقیقات سلامت زنان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۴. دکترای علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات ناباروری منتصریه مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۱۷ **تاریخ پذیرش مقاله:** ۱۳۹۱/۲/۱۷

خلاصه

مقدمه: امروزه جهت افزایش میزان باروری در آزمایشگاه های لقاح آزمایشگاهی از تکنیک های مختلف هچینگ (خارج کردن) کمک شده (AH) از جمله لیزر هچینگ کمک شده (LAH) برای کمک به خارج کردن جنین از زوناپلوسیدای ضخیم استفاده می شود. با توجه به نتایج متناقض درباره تأثیر لیزر هچینگ کمکی بر میزان باروری در جنین های دارای زوناپلوسیدای ضخیم، مطالعه حاضر با هدف تعیین ارتباط ضخامت زوناپلوسیدا توسط لیزر هچینگ کمکی بر افزایش میزان باروری در بیماران نابارور تحت درمان به روش لقاح داخل آزمایشگاهی در مرکز ناباروری مشهد در سال ۸۹ انجام شد.

روش کار: این مطالعه مورد- شاهدی در سال ۱۳۸۹ بر روی ۱۰۱ زوج نابارور تحت درمان با IVF انجام شد. ۵۰ نفر به عنوان گروه مورد و ۵۱ نفر به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. افراد دو گروه از نظر سن مادر، تعداد اووسیت خارج شده، تعداد اووسیت بارور شده و تعداد جنین های منتقل شده با هم همسان بودند و در ضمن در هر دو گروه از جنین های با کیفیت مشابه استفاده شد. میزان وقوع بارداری در دو گروه با استفاده از آزمون اندازه گیری ß–HCG (زنجیره بتا گونادوتروفین کوریونی انسان) و سونوگرافی تعیین شد. داده ها پس از گردآوری با استفاده از آزمون های تی و کای دو و نرم افزارهای SPSS (نسخه ۱۶) و Excel با ضریب اطمینان ۹۵٪ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میزان p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها: بین افراد دو گروه از نظر سن، تعداد اووسیت بارور شده، تعداد اووسیت خارج شده، تعداد و کیفیت جنین های منتقل شده تفاوت معنی داری مشاهده نشد (p=۰/۸۳۷). میزان بارداری در گروه شاهد و مورد به ترتیب ۱۵/۷ و ۳۴ درصد بود که تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی دار بود (p=۰/۰۳۳).

نتیجه گیری: انجام روش هچینگ کمک شده لیزری بر روی جنین های دارای زوناپلوسیدای ضخیم باعث افزایش میزان باروری می شود.

کلمات کلیدی: ضخامت زوناپلوسیدا، لقاح داخل آزمایشگاهی، میزان باروری، هچینگ کمکی لیزری

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** اعظم سادات امینی؛ حاکمیت بالینی بیمارستان امام رضا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
تلفن: ۰۹۱۵۱۳۷۲۱۱۴؛ **پست الکترونیک:** Amini.elahe@gmail.com

مقدمه

فرایند زوناهچینگ یکی از مهمترین عواملی است که میزان باروری و لانه گزینی را تعیین می کند. در شرایط طبیعی اطراف تخمک با لایه ای از مولکول های قندی پروتئینی به نام زوناپلوسیدا (ZP)[2] پوشیده شده است. این لایه علاوه بر محافظت تخمک و جنین، پس از مرحله لقاح به عنوان یکی از عوامل هدایت جنین از لوله رحم به سمت رحم می باشد و مانع از جدا شدن سلول های جنین از یکدیگر می شود. همچنین پس از وارد شدن یک اسپرم به تخمک، ساختار آن چنان تغییر می کند که مانع ورود اسپرم های بعدی می شود (۱، ۳).

پس از رسیدن جنین به حفره رحم و تشکیل بلاستوسیت در روز پنجم پس از لقاح، این لایه به طور طبیعی نازک شده و به کمک آنزیم هایی که از جنین و دیواره رحم ترشح می شوند، پاره می شود تا امکان چسبیدن جنین و نفوذ آن به داخل دیواره رحم فراهم شود. به این فرایند پاره شدن و خروج جنین از لایه زوناپلوسیدا، هچینگ[3] گفته می شود. (۴، ۵).

در مواردی که لقاح آزمایشگاهی صورت می گیرد، برخی عوامل مانع نازک شدن زوناپلوسیدا و پارگی آن بر اثر آنزیم ها می شود. مهمترین این عوامل عبارتند از سن مادر (بیشتر از ۳۷ سال)، سطح هورمون محرک فولیکولی بالا در خون مادر (به طور معمول در ارتباط با کاهش کیفیت جنین) و ضخیم شدن (بالاتر از ۱۷ میکرومتر) و سخت شدن زوناپلوسیدا به علت شرایطی که محیط کشت به آن اعمال می کند (۶، ۸، ۹). یکی از دلایلی که می تواند باعث کاهش کیفیت جنین های فریز شده شود (بهترین روش برای انتقال جنین های تازه) و یا سبب سخت تر کردن زوناپلوسیدا در طی فرایند فریز کردن شود، فرایند ذوب شدن پس از انجماد است (۷).

خارج شدن بلاستوسیت از زوناپلوسیدا که اصطلاحاً هچینگ نامیده می شود، یک اتفاق مهم در باروری می باشد. در صورتی که بلاستوسیت نتواند عمل هچینگ را در دوره زمانی که رحم آماده پذیرش و جایگزینی است، انجام دهد بارداری رخ نخواهد داد. امروزه برای کمک به خارج کردن جنین از زوناپلوسیدا از روش هچینگ کمک شده استفاده می شود. روش های مختلفی برای هچینگ کمک شده (AH)[4] استفاده شده است که شامل روش های مکانیکی، روش های شیمیایی (آنزیمی) و اشعه لیزر می باشد (۱۰-۱۲).

کارایی بالای تکنیک لیزر و درصد بالای بارداری ناشی از آن، به اثبات رسیده است. در روش اشعه لیزر، این اشعه به صورت کاملاً کنترل شده به بخشی از دیواره رویان یا به عبارتی زوناپلوسیدا تابیده می شود و طولی حدود ۳۵ تا ۴۰ میکرومتر از زوناپلوسیدا را حذف می کنند (۱۴, ۱۸). مطالعه حاضر با هدف تعیین ارتباط ضخامت زوناپلوسیدا توسط لیزر هچینگ در افزایش میزان باروری در بیماران نابارور تحت درمان به روش IVF[5] در مرکز ناباروری منتصریه مشهد انجام شد.

روش کار

این مطالعه مورد- شاهدی در سال ۱۳۸۹ بر روی ۱۰۱ زوج نابارور تحت درمان با روش IVF در مرکز تحقیقاتی درمانی منتصریه مشهد انجام شد. ۵۰ نفر به عنوان گروه مورد و ۵۱ نفر به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. گروه شاهد شامل افرادی می شد که دارای وضعیت زونای ضخیم بوده و عمل لیزر هچینگ بر روی آنها اعمال نمی شد (بدون دستکاری زونا) و گروه مورد افرادی بودند که دارای زونای ضخیم بوده و عمل لیزر هچینگ بر روی آنها اعمال می شد (استفاده از لیزر برای سوراخ کردن زونا).

پس از انجام معاینات اولیه و بررسی زوجین از نظر وضعیت سلول جنسی نر و ماده، در موعد مناسب سلول های جنسی ماده با تحریک تخمدان با روش های متداول از نمونه ها به دست آمد و سپس با روش لقاح آزمایشگاهی- تزریق اسپرم داخل سیتوپلاسم تخمک (ICSI-IVF)[6] با سلول جنسی نر لقاح داده شد تا سلول تخم تشکیل شود. پس از تشکیل تخم، تخمک لقاح یافته در انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند تا تقسیمات اولیه انجام شود. سپس در

[2] Zona pellucid (ZP)
[3] Hatching
[4] Assisted Hatching (AH)
[5] In-Vitro Fertilization
[6] Intracytoplasmic sperm injection

مرحله ۸ سلولی و پس از ۷۲ ساعت، جنین ها از انکوباتور خارج شده و بر روی آنها عمل لیزر هچینگ انجام شد. افراد دو گروه از نظر سن مادر، تعداد اووسیت بارور شده، تعداد اووسیت خارج شده و تعداد جنین های منتقل شده با هم همسان بودند. در روز سوم، جنین های با کیفیت بالا در رحم مادر هر دو گروه منتقل شدند. حدود ۱۵ الی ۲۰ روز پس از انتقال جنین، با استفاده از اندازه گیری ß–HCG و سونوگرافی میزان موفقیت بارداری در گروه مورد و شاهد تعیین و با هم مقایسه شد. داده ها پس از جمع آوری با استفاده از آزمون تی و کای دو و نرم افزارهای آماری SPSS (نسخه ۱۶) و Excel با ضریب اطمینان ۹۵٪ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

مشخصات بالینی گروه مورد و شاهد در جدول ۱ نشان داده شده است. آزمون تی تفاوت معنی داری را بین سن بیماران، تعداد اووسیت آسپیره شده، تعداد اووسیت بارور شده و تعداد و کیفیت جنین های منتقل شده در افراد دو گروه نشان نداد (p=۰/۸۳۷).

جدول ۱- خصوصیات بالینی گروه شاهد و مورد در بررسی اثر زوناهچینگ در افزایش میزان باروری در جنین های دارای زونای ضخیم توسط اشعه لیزر

خصوصیات بالینی	گروه مورد	گروه شاهد
تعداد بیماران	۵۰	۵۱
سن (سال)	۳۲/۷۸±۰/۸۷۷	۳۲/۵۳±۰/۸۴۵
تعداد اووسیت خارج شده	۹/۹۸±۵/۸۳	۹/۹۲±۵/۱۸
تعداد اووسیت بارور شده	۶/۱۴±۴/۲۱	۶/۷۸±۳/۸۶
تعداد جنین منتقل شده	۴/۹۷±۲/۷۶	۵/۳۵±۲/۴۰

میزان شیوع بارداری در دو گروه شاهد و مورد در جدول ۲ ارائه شده است. آزمون کای دو تفاوت معنی داری را بین میزان بارداری در دو گروه شاهد و مورد که هر دو گروه دارای زونای ضخیم بودند، نشان داد (p=۰/۰۳۳).

جدول۲- میزان شیوع بارداری در گروه شاهد و مورد در بررسی اثر زوناهچینگ در افزایش میزان باروری در جنین های دارای زونای ضخیم توسط اشعه لیزر

وقوع بارداری / گروه های مورد مطالعه		کل	حاملگی مثبت	حاملگی منفی
شاهد	فراوانی	۵۱	۸	۴۳
	درصد سطری فراوانی	٪۱۰۰	٪۱۵/۷	٪۸۴/۳
مورد	فراوانی	۵۰	۱۷	۳۳
	درصد سطری فراوانی	٪۱۰۰	٪۳۴	٪۶۶
کل	فراوانی	۱۰۱	۲۵	۷۶
	درصد سطری فراوانی	٪۱۰۰	٪۲۴/۸	٪۷۵/۲

بحث

نتایج مطالعه نشان داد که افزایش میزان بارداری در دو گروه مورد و شاهد که هر دو دارای زوناپلوسیدای ضخیم بودند، تفاوت معنی داری داشت. ضخیم شدن و سخت شدن زوناپلوسیدا پس از ورود اسپرم فرایندی طبیعی است که از پلی اسپرمی ممانعت می کند و باعث حمایت جنین در طی مراحل اولیه رشد و نمو شده و از جنین هنگام انتقال در لوله رحم محافظت می

کند. همانطور که تقسیمات جنینی صورت می گیرد، زوناپلوسیدا نازک تر شده و برای یک شکاف طبیعی آماده می شود (مرحله بلاستوسیت) (۱۱, ۱۵, ۲۲).
وقوع بارداری در جنین های ذوب شده پس از انجماد در مقایسه با جنین های تازه، کمتر می باشد. تاکنون علت این تفاوت به طور کامل توضیح داده نشده است. مطمئناً یکی از دلایلی که ممکن است موجب تغییراتی در زوناپلوسیدای جنین شود، سخت شدن این لایه در طی فریز شدن و سپس ذوب شدن آن می باشد (۱۹، ۲۰).
کوهن و همکاران (۱۹۹۰) عنوان کردند که هچینگ کمک شده لیزری (LAH[7]) به عنوان یک روش کمکی برای رها شدن جنین از زوناپلوسیدا می باشد که استفاده روتین از این فرایند هنوز بحث انگیز است (۲). مطالعه بلیک و همکاران (۲۰۰۱) نشان داد که نازک کردن لیزری زوناپلوسیدا مؤثر است و می تواند مزیت های مهمی علاوه بر دیگر تکنیک های هچینگ کمکی که سوراخ ایجاد می کردند، داشته باشد (۱۳). مطالعه گابریلسن و همکاران (۲۰۰۴) و همچنین چک و همکاران (۱۹۹۶) نشان داد که میزان لانه گزینی در بیمارانی که زوناپلوسیدا آنان پس از گرم شدن توسط محلول اسید تایرود[8] و با روش شیمیایی برش داده شد، به طور معنی داری بالاتر بود (۲۶). به طور مشابه این نتایج توسط تاو و تامیس (۱۹۹۷) در بیماران بالاتر از ۳۸ سال با زوناپلوسیدای ضخیم (بالاتر از ۱۷ میکرومتر)، کیفیت ضعیف جنین و چندین شکست در برنامه های IVF به دست آمد (۲). با توجه به اینکه نگ (۲۰۰۴) مطالعات آماری مهمی را که میزان لانه گزینی را بین جنین های ذوب شده پس از انجماد در گروه هایی که با و بدون برش زوناپلوسیدا هستند نشان نداد، در همان زمان پیشنهاد شد که در برخی بیماران، فرایند LAH ممکن است مفید باشد. به کارگیری برش لیزری زوناپلوسیدا در یک گروه بالای ۳۸ سال و زوناپلوسیدای ضخیم بالاتر از ۱۶ میکرومتر میزان لانه گزینی را افزایش داد (۲۴). مطالعه پریمی و همکاران (۲۰۰۴) نشان داد که میزان لانه گزینی و درصد بارداری در بیمارانی که برش لیزری زوناپلوسیدا را متحمل شده بودند، خصوصاً در گروه هایی که با آنتی بیوتیک درمان نشده بودند، کمتر است. سپس میزان لانه گزینی در بیمارانی که با آنتی بیوتیک درمان شده بودند، تا ۶ درصد افزایش یافت (۲۳).
مطالعه بالابان و همکاران (۲۰۰۲) نشان داد که میزان لانه گزینی در همه روش های AH مشابه است. اما سایر مطالعات بالابان در سال ۲۰۰۶ نشان داد که میزان بارداری و درصد لانه گزینی بعد از به کارگیری فرایند LAH در مقایسه با گروه Non LAH به طور معنی داری افزایش داشته است. جستجوها توسط بالابان روی یک جمعیت بزرگتر انجام شد. در همه نمونه ها ICSI انجام شده بود، تولید مثل و انتقال جنین های تازه در زمان کوتاه انجام شد تا حدی که شرایط محیطی آزمایشگاه تغییر نکرده باشد. زوناپلوسیدا فقط در جنین هایی برش داده شده بود که در طی ۲۰ ساعت شروع به گرم شدن کردند (۱۷).
همچنین نگ و همکاران (۲۰۰۵) متذکر شدند که این نتایج در صورتی می تواند متفاوت باشد که فرایند بر روی جنین هایی انجام شود که پس از گرم شدن تقسیم می شود (۲۴).
مطالعه ادگار و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که نابودی یک بلاستومر در طی لانه گزینی یک فرایند LAH می تواند منجر به تغییرات سمی سلول های دیگر در جنین شود. این مکانیسم هنوز ناشناخته است (۲۵).
زاک و همکاران (۲۰۰۹) و کولو و همکاران (۲۰۱۰) اظهار داشتند که نازک کردن لیزری زوناپلوسیدا تأثیر مفیدی در میزان بارداری و لانه گزینی ندارد و برای بررسی دقیق تر نیاز به مطالعات بیشتر و نمونه آماری بزرگتری می باشد (۲، ۱۶).
نتایج اولیه این مطالعه نیز نشان داد که برش لیزری زوناپلوسیدای ضخیم اثر مهمی روی میزان لانه گزینی و درصد بارداری دارد.

هچینگ کمکی توسط لیزر: سوراخ کردن لیزری زوناپلوسیدا اولین بار در سال ۱۹۹۱ توسط دو گروه پیشرو در این زمینه به نام های تادیر و پالانکار گزارش

[7] Laser assisted Hatching (LAH)
[8] Acidic Tyrodes

شد. لیزر یک ابزار ایده آل برای فرایند جراحی های میکروسکوپی می باشد زیرا انرژی به آسانی بر روی محدوده هدف متمرکز شده و یک سوراخ کنترل شده و دقیق ایجاد می کند.

اشعه لیزر هم می تواند به صورت مستقیم با استفاده از لنزهای نوری مماسی به جنین از مسیر زوناپلوسیدا هدایت شود که روش غیر تماسی (Non contact) نامیده می شود و همچنین می تواند از طریق یک فیبر نوری که جنین را لمس می کند هدایت شود که این روش، روش تماسی (Contact) نامیده می شود. در ابتدا روش غیر تماسی برای دستکاری میکروسکوپی گامت با استفاده از طول موج های مختلف لیزر به کار برده شد. بعد از آن روش تماسی به همراه طول موج های ماوراء بنفش و یا مادون قرمز استفاده شد.

به هر حال مزیت های تکنیکی غیر تماسی به علت اینکه پتانسیل تابش اشعه ماوراء بنفش باعث صدمات مخرب ژنتیکی می شود، منجر به برتری عمومی روش غیر تماسی با استفاده از روش لیزر دیودی ۱/۴۸ میکرومتری شد. در ابتدا لیزر برای ایجاد سوراخ کامل زوناپلوسیدای ضخیم استفاده شد.

مطالعات بیشتر نشان دهنده افزایش میزان بارداری با استفاده از لیزر برای نازک کردن یک منطقه گسترده از زوناپلوسیدا در مقایسه با ایجاد یک سوراخ کامل مجزا می باشد.

برش جزئی لیزری زوناپلوسیدا نیز می تواند با دقت و تکرار پذیری بالا بدون تأثیر منفی بر روی رشد جنینی انجام شود. این تکنیک آسان و با توجه به زمان مورد استفاده، بسیار مؤثر است و در محیط های استریل بدون هیچ دستکاری میکروسکوپی اضافی می تواند انجام شود. با استفاده از لیزر دیودی ۱/۴۸ میکروکتری مادون قرمز این امکان فراهم می شود تا زوناپلوسیدا حتی در بلاستوسیت های گسترش یافته بدون آسیب به آن باز شود. همچنین ایمنی اشعه لیزر با استفاده از لیزر دیودی ۱/۴۸ میکرومتری در تخمک و زیگوت انسان و موش به طور کامل مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است.

نتیجه گیری

سوراخ کردن زوناپلوسیدای جنین های منجمد به وسیله لیزر روشی مناسب برای فرار جنین از دام زونا برای انجام مرحله حساس هچینگ می باشد. سوراخ کردن زونای ضخیم علاوه بر اینکه باعث افزایش معنی دار میزان شکل گیری بلاستوسیت در جنین های منجمد- ذوب شده می شود، میزان وقوع مرگ سلولی را در حد قابل قبول حفظ می کند و از کیفیت جنین ها نمی کاهد. انجام شیوه LAH روی جنین های دارای زوناپلوسیدای ضخیم سبب افزایش میزان باروری می شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مرکز تحقیقاتی و درمانی منتصریه مشهد که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Bansal P, Gupta K . Binding characteristic of sperm with recombinant human ZP glycoprotein- 3 coated beads, Indian J med 2009; 130(1): 37 - 43.
2. Zak T, Kubiaczyk B, Kaczmarek A, Kaczmarec D, Dera A . Laser assisted hatching of ZP - is increase an effect on implantation an pregnancy rate? Preliminary observation, Archives of perinatal Medicine 2009; 15(4) : 197 – 201.
3. Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Kulski P , Bottero J, Porcher R. A prospective randomized study to assess the benefit of partial ZP digestion before frozen – thawed embryo transfers , Human Reproduction 2006 ; 21(9): 2384-2389.
4. Aktan E, Demirol A, Bozkurt K, Ozer d, Gurgan T. The effect of zona thinning size on implantation and pregnancy rate of ICSI-ET patients with advanced women age . Middle East Fertility Journal 2006 ;11(3) : 191 – 199.
5. Sagoskin A, Levy M , Tucker M, Richter K , Erich A . Laser assisted hatching in good prognosis patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer;a randomized controlled trial – Fertility and sterility 2007 ; 87(2) : 283-387.

6. Sants Filho E , Nobel A , Wells D . A Review on Automatic Analysis of Human Embryo Microscope Images . The open Biomedical Engineering Journal 2010 ; 4(1) : 170 – 177 .
7. Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K, Assisted Hatching at the time of warming improves pregnancy and implantation outcomes for vitrified Human Expanded Blastocyst Transfer , J. Mamm. Ova Res 2004 ; (1) : 118-122 .
8. Das S, Black D, Farquhar C, Seif MM, Assisted hatching on assisted conception (IVF and ICSI) , Cochrane Database Syst Rev 2009; 15(2) : 189 – 195 .
9. Hiraoka K, Hiraoka K, Horuchi T, Kusuda T,okano S, Kinutani M, Kinutani K. Impact of the size of Zona pellucida thinning area on vitrified – warmed cleavage – stage embryo transfer : a prospective , randomized study. J Assisted report Genet 2009 ; 26 (9-10) : 515 – 21 .
10. Peterson C, AL Muri, RL Baruffi, JBA Oliveira. Implantation failures : Success of assisted hatching with quarter – laser zona thinning . Reproductive Biomedicine Online 2004; 10 (2): 224 – 229.
11. Ebner T, Moser M Tews G, Possible application of a non contact 1.48 um wavelength diode laser in assisted reproduction technologies. Human Reproduction 2005; 11(4) : 425- 435.
12. Balaban B, Urman B , Yakin K, Isiklar A, Laser – Assisted hatching increase pregnancy and implantation rate in cryopreserved embryos that were allowed to cleave in vitro after thawing: a prospective randomized study , Human Reproduction 2006 ; 11(8) : 2136 – 2140 .
13. Blake A, Forsberg S , Johansson R.,Wikland M . Laser ZP thinning – an alternative approach to assisted hatching Human Reproduction 2001; 16(9): 1954-1964.
14. Basam A, Mustafa M, Khaled M, Assisted hatching : routine or selective application in ivf .Middle East Fertility Society Journal 2004 ; 9(3) :198-205 .
15. Hageman A, Lanzendorf S, Jung heim E, Chang A, Ratts V, Odem R, A prospective, randomized, double-blinded study of assisted hatching in women younger than 38 years undergoing in vitro fertilization. Fertility and sterility 2010; 93 (2) :586 – 591.
16. Kutlu P, Atvare O, Vanlioglu O. Laser assisted zona thinning technique has no beneficial effect on the ART outcomes of two different maternal Age groupes. J Assisted Report Genet 2010; [Epub ahead of print] .
17. Balaban B , Urman B , Alatas C , Mercan R , A comparison of four different techniques of assisted hatching . Human Reproduction 2002; 17(5): 1239 – 1243.
18. Hiraoka A, Fuchiwaki M, Hpraoka K, Horiuchi T, Murakami T, Kinutani M, Kinutani K . Effect of size of ZP opening by laser assisted hatching on clinical outcome of frozen cleaved embryos that were cultured to blastocyst after thawing in women with multiple implantation failures of embryo transfer : a retrospective study : J Assist Reprod Genet 2008 ; 25(1P) :129-135 .
19. Edward B. IVF, IVM natural cycle IVF, minimal stimulation IVF – time for a re think . Reproductive Biomedicine 2007; 15(1): 106 – 119.
20. Ghulmiyyah L, Perloe M, Tucker M, Zimmermann J, Eller D. Monochorionic- triamniotic triplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection, assisted hatching and two embryo transfer: first reported case following IVF. Biomed Center 2004.
21. Hammadeh M, Hammadeh C, Refaat K, Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. Assisted Reproduction 2010; 10(3): 9495 – 9506.
22. Sifer C , Sellami A , Poncelet C , et al . A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen – thawed embryo transfers. Hum.Reprod 2006;21: 2384-2389 .
23. Primi M.P ; Senn A ; Montag M. et al . (2004) A European multicenter prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with a diode laser and the benefit of an immunosuppressive / antibiotic treatment in different patient population. Hum. Reprod 2004 ; 19: 2325-2333
24. Ng E.H.Y., Naveed F.,Lau E.Y.,et al. A randomized double blind controlled study of the efficacy of laser assisted hatching on implantation and pregnancy rates of frozen – thawed embryo transfer at the cleavage stage. Hum.reprod 2005; 20: 979 - 985.
25. Edgar D.H., Bourne H., Speirs A.L., McBain J.C. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. Hum. Reprod. 2000. 15: 175-179.