

مقایسه نتایج انتقال جنین به دو روش یک مرحله‌ای (SET) و دو مرحله‌ای (DET) در سیکل‌های ART

دکتر عباس افلاطونیان^۱، دکتر مهناز منصوری ترشیزی^۲، دکتر رباب داور^۳، دکترراضیه دهقانی فیروزآبادی^۴، دکتر رضا افلاطونیان^۵، محمدحسین امیرارجمند^۶، بهروز افلاطونیان^۷، مهرداد سلیمانی^۸

چکیده

مقدمه: عمده ترین هدف برنامه های ART (Assisted Reproductive Technology)، رساندن میزان لانه گزینی جنین به حد فیزیولوژیک در یک سیکل نرمال است. جهت افزایش شانس فوق دو روش پیشنهاد شده: ارتقای کیفیت جنین و افزایش قدرت پذیرش آندومتر که هنوز این مورد قطعیت نیافته است.

روش بررسی: این مطالعه از نوع آینده نگر و به روش Clinical Trial جهت بررسی انتقال دو مرحله ای جنین (DET) در مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری و بیمارستان مادر یزد بر روی ۱۶۰ سیکل ART (IVF یا ICSI) انجام گردیده است و بدین ترتیب دو روش انتقال جنین در یک مرحله (گروه شاهد) و در دو مرحله (گروه مورد) با یکدیگر مقایسه شده اند و فرض بر این قرار گرفته است که در انتقال دو مرحله ای، جنین منتقل شده در مرحله اول می تواند سبب تحریک آندومتر و شروع مکانیسم های تسهیل کننده لانه گزینی گردیده و به دنبال آن محیط برای جنین یا جنین های مرحله دوم مساعد گردد. دو گروه از نظر میانگین سن زن و مرد، طول مدت و علت نازایی تفاوت معنی داری نداشتند. روش تحریک تخمدان به وسیله استفاده از آگونیست GnRH (بوسرلین) و به روش Long Protocol بوده است. اندازه فولیکول از روز نهم سیکل به طور سریال اندازه گیری شده و پس از تزریق ۱۰۰۰۰ IU HCG و انجام پونکسیون تخمدان، حمایت فاز لوتئال به وسیله تجویز شیاف یا آمپول پروژسترون انجام شده است. سپس بیماران به صورت تصادفی آسان به دو گروه تقسیم شدند. یک گروه شامل ۸۰ بیمار که انتقال جنین دو مرحله ای در آنها صورت گرفت. در مرحله اول روز سوم با ۲ امبریو و در مرحله دوم روز پنجم با ۲ یا ۳ امبریو دیگر انتقال انجام شد. در گروه یک مرحله ای، برای ۸۰ بیمار انتقال جنین فقط در یک مرحله یعنی ۴۸ ساعت پس از پونکسیون انجام شد و نتیجه حاملگی به صورت گزارش تیراژ مثبت BHCG در روز چهاردهم پس از انتقال جنین در دو گروه جمع آوری و با استفاده از آزمونهای Fisher Exact Test و t.test و Chi-Square تحلیل گردید.

یافته ها: نتایج بارداری در دو گروه DET و SET با یکدیگر مقایسه گردیدند. در گروه DET دو بیمار و در گروه SET، ۱۴ بیمار به دلیل عدم دسترسی برای پیگیری نتیجه حاملگی از مطالعه حذف شدند. نتایج نشان می دهد که از نظر میزان حاملگی به طور کلی تفاوت معنی دار آماری بین دو گروه DET و SET وجود ندارد (p=1.000) و در هیچ یک از دو گروه رابطه معنی دار آماری بین نتیجه حاملگی با روش آزمایشگاهی IVF/ICSI، نتیجه حاملگی با سن زن و نتیجه حاملگی با تعداد جنین منتقل شده بدست نیامد. نتیجه گیری: اگرچه نتیجه حاملگی در دو گروه مشابه بود ولی نتایجی که در زنان بالاتر از ۳۵ سال در گروه DET به دست آمد، ۱/۵ برابر بیش از گروه SET بود. البته این پژوهش یک مطالعه اولیه است و نیاز به بررسی های بیشتری دارد.

واژه های کلیدی: انتقال یک مرحله ای جنین (Single Embryo Transfer)، ART (باروری کمک شده)، انتقال دو مرحله ای جنین (Double Embryo Transfer)

هدف از به کارگیری روش لقاح خارج رحمی (IVF) از سالیان گذشته،

رساندن میزان لانه گزینی جنین به حد فیزیولوژیک لانه گزینی بالینی در انسان

با یک جنین و در یک سیکل نرمال بوده که حدود ۳۰٪ است. ولی هنوز

علیرغم پیشرفت های بسیار در روش های تحریک تخمک گذاری، جمع آوری

تخمک و افزایش قدرت باروری و رشد جنین در آزمایشگاه، میزان لانه

گزینی به دنبال ART پایین تر از این حد می باشد^(۱۰). دو فاکتور مهم در لانه

۱- دانشیار گروه زنان و زایمان - فلوشیپ نازایی

۲- فلوشیپ نازایی

۳- استادیار گروه زنان و زایمان - فلوشیپ نازایی

۵- پزشک عمومی

۷ و ۸- کارشناس آزمایشگاه مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری

۱ و ۳- مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد

مقدمه

بررسی شدند. این بیماران در محدوده سنی ۵۰-۲۰ سال قرار داشتند و به علل مختلف نازایی شامل **Unexplained, Female Factor (Ovarian & Tubal), Male Factor**، کاندید IVF/ICSI شدند. روش تحریک تخمک گذاری در بیماران عمدتاً استفاده از آگونیست GnRH (بوسرلین) به روش Long Protocol بوده (تزیق روزانه ۰/۵ سی سی بوسرلین زیرجلدی از روز بیستم سیکل و با شروع قاعدگی تقلیل دوز به روزانه ۰/۲۵ سی سی) و HMG نیز از روز دوم قاعدگی با دوز ۲۲۵ واحد روزانه شروع گردیده و در تعداد کمی از بیماران از کلومیفن و HMG استفاده شده است. اندازه فولیکول از روز نهم سیکل قاعدگی به طور سریال اندازه گیری شده و پس از تزریق HCG و انجام پونکسیون تخمدان، حمایت فاز لوتئال در تمام بیماران به صورت استفاده از شیاف یا آمپول پروژسترون شروع گردیده است و سپس بیماران به صورت تصادفی آسان به دو گروه تقسیم گردیده اند:

- ۱- گروه DET شامل ۸۰ بیمار که انتقال جنین در دو مرحله یعنی روز سوم (با ۲ امبريو) و مرحله دوم در روز پنجم (با ۳-۲ امبريو) انجام شده است.
- ۲- گروه SET، شامل ۸۰ بیمار می باشد که انتقال جنین فقط در یک مرحله یعنی ۴۸ ساعت بعد از پونکسیون انجام شده است. انتقال جنین به وسیله یک نفر و با یک نوع کاتتر انجام شده است و سپس نتایج حاصله شامل بررسی نتیجه حاملگی به صورت گزارش تیتراژ مثبت BHCG در روز چهاردهم بعد از انتقال جنین در دو گروه جمع آوری شده و تحت آنالیز آماری به روش Fisher Exact Test، Chi-Square و t-test قرار گرفته است. در گروه DET ۲ بیمار و در گروه SET ۱۴ بیمار به دلیل عدم دسترسی برای پیگیری نتیجه حاملگی از مطالعه حذف شدند.

نتایج

این مطالعه بر روی ۱۶۰ بیمار با علت نازایی اولیه که تحت IVF/ICSI قرار گرفته اند انجام گردیده است و دو روش انتقال جنین در یک مرحله (SET) و در دو مرحله (DET) از نظر نتایج بارداری با یکدیگر مقایسه گردیده اند.

میانگین سن مرد در گروه DET، ۳۴/۸ سال و در گروه SET برابر ۳۵/۳ سال است که تفاوت معنی دار نمی باشد و میانگین سن زن نیز در هر دو گروه ۲۹ سال می باشد.

میانگین مدت نازایی در گروه DET برابر ۸/۶ سال و در گروه SET برابر ۸/۸ سال است. از نظر علت نازایی که شامل فاکتورهای Male-MIX - Ovarian - Unexplained - Tubal است که از نظر آماری بین دو گروه تفاوت معنی داری وجود ندارد.

گزینی جنین مؤثر می باشد که بهبود وضعیت هر کدام می تواند در نتایج بارداری نقش مهمی داشته باشد. اول کیفیت جنین و دوم پذیرش آندومتر و واکنش بین جنین و آندومتر است. جهت بهبود کیفیت جنین در برنامه های ART روشهای متعددی توصیه گردیده است که شامل:

(۱) انتقال جنین با جنین های دارای کیفیت بالا (۲) انتقال جنین در مرحله بلاستوسیست که ثابت شده است در مقایسه با انتقال جنین در مراحل اولیه تقسیم، این مرحله سبب بهبود میزان باروری می گردد (۳ و ۷) و از مزایای انتقال جنین در این مرحله می توان کاهش خطر حاملگی خارج از رحم، افزایش پذیرش آندومتر و کاهش انقباض رحمی در هنگام انتقال جنین به علت پیشرفت فاز لوتئال را نام برد (۹، ۱۱) و همچنین ریسک چندقلویی کاهش می یابد و در فاصله تشکیل بلاستوسیست، جنین هایی که در محیط کشت دچار اختلال رشد شده اند مشخص گردند (۱۰). در مورد فاکتور دوم، یعنی پذیرش آندومتر نیز تحقیقات وسیعی انجام شده است و شاخص های هیستولوژیک بیوشیمیایی و مورفولوژیک زیادی وجود دارند که می توانند در واکنش متقابل بین مادر و جنین نقش داشته باشند نظیر اینتگرینها، سیستمهای انترلوکیتی، سیتوکینها و حتی هورمون استروژن و HCG که در طی سیکلهای تحریک تخمک گذاری بر روی پذیرش آندومتر اثر دارند (۵، ۱۲). در این رابطه تحقیقاتی در موش انجام شده است که ثابت گردیده وجود یک جنین در لوله ها و یا کاویته رحمی می تواند اثرات بیولوژیک بر روی آندومتر را تحریک نماید و بر همین اساس می توان گفت که جنینهای در مرحله قبل از لانه گزینی به طور فعال، مراحل لانه گزینی را تحریک و فعال نموده و به دنبال آن پذیرش جنین توسط آندومتر تسهیل می گردد (۱۳، ۱۴). بر همین اساس، در این تحقیق نتایج IVF/ICSI به روش انتقال جنین در دو مرحله با فرض بر اینکه جنین انتقال یافته در مرحله اول سبب تحریک پذیرش آندومتر گردیده و به دنبال آن محیط را برای جنین مرحله دوم مساعد می نماید با روش روتین انتقال جنین در یک مرحله مقایسه گردیده است.

روش بررسی

در مطالعه ای آینده نگر از نوع Clinical Trial ۱۶۰ زوج مراجعه کننده به مرکز تحقیقاتی درممانی ناباروری و بیمارستان مادر یزد، در محدوده سالهای ۸۰-۱۳۷۹

نتیجه حاملگی			
مثبت	۲	۲۴	۲۶
	٪۱۶/۷	٪۳۶/۴	٪۳۳/۳
منفی	۱۰	۴۲	۵۲
	٪۸۳/۳	٪۶۳/۶	٪۶۶/۷
جمع کل	۱۲	۶۶	۷۸
	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰

$$p = ۰/۱۸۳$$

در گروه SET از ۶۶ بیمار، ۱۰ بیمار بالای ۳۵ سال و ۵۶ بیمار زیر ۳۵ سال سن داشتند. از ۱۰ بیمار بالای ۳۵ سال تنها یک بیمار (۱۰٪) حاملگی مثبت داشت و از ۵۶ بیمار زیر ۳۵ سال، ۲۱ بیمار (۳۷/۵٪) حاملگی مثبت داشتند که تفاوت آماری آنها معنی دار نمی باشد (جدول ۳).

جدول ۳: توزیع فراوانی نتیجه حاملگی بر حسب سن زن در گروه SET

نتیجه حاملگی	بالای ۳۵ سال	زیر ۳۵ سال	جمع کل
مثبت	۱	۲۱	۲۲
	٪۱۰	٪۳۷/۵	٪۳۳/۳
منفی	۹	۳۵	۴۴
	٪۹۰	٪۶۲/۵	٪۶۶/۷
جمع کل	۱۰	۵۶	۶۶
	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰

$$p = ۰/۰۸۹$$

در گروه DET از ۷۸ بیمار، ۱۲ بیمار بالای ۳۵ سال و ۶۶ بیمار زیر ۳۵ سال سن داشتند. از ۱۲ بیمار بالای ۳۵ سال تنها ۲ بیمار (۱۶/۷٪) حاملگی مثبت و از ۶۶ بیمار زیر ۳۵ سال، ۲۴ بیمار (۳۶/۴٪) حاملگی مثبت داشتند. اختلاف آماری معنی دار نیست (جدول ۲).

در گروه SET، از ۱۲ بیمار IVF شده، ۴ بیمار (۳۳/۳٪) حامله شدند و ۸ بیمار (۶۶/۷٪) حاملگی نداشتند. از ۵۴ بیمار ICSI شده، ۱۸ بیمار (۳۳/۳٪) نتیجه حاملگی مثبت و ۳۶ بیمار (۶۶/۷٪)، نتیجه حاملگی منفی داشتند. نتیجه حاملگی در هر دو گروه مشابه بود و تفاوتی نداشت.

روش انجام کار آزمایشگاهی به صورت IVF و ICSI بوده است و در گروه DET، ۳۸/۵٪ بیمار IVF و ۶۱/۵٪ بیمار ICSI شده اند و در گروه SET، ۱۸/۲٪ بیمار IVF و ۸۱/۸٪ بیمار ICSI شده اند که تفاوت دو گروه از نظر آماری معنی دار می باشد ($p=0.008$). اما با توجه به انتقال جنین مناسب در هر دو روش این تفاوت تأثیری در نتایج نخواهد داشت.

طبق جدول (۱) نتایج انتقال جنین به صورت حاملگی کلینیکال در دو گروه DET و SET مقایسه گردیده است. در گروه DET از ۷۸ بیمار، ۵۲ بیمار (۶۶/۷٪) نتیجه حاملگی منفی داشتند و ۲۶ بیمار (۳۳/۳٪) حامله شدند. در گروه SET از ۶۶ بیمار، ۴۴ بیمار (۶۶/۷٪) حاملگی نداشتند و ۲۲ بیمار (۳۳/۳٪) حامله شدند. طبق محاسبات بدست آمده اختلاف معنی دار بین این دو گروه وجود ندارد. از نظر میانگین تعداد امبریو، در گروه DET برابر ۶/۱۴ و در گروه SET ۳/۷ می باشد که از نظر آماری تفاوت معنی دار است ($p=۰/۰۰۰۱$).

جدول ۱: مقایسه نتیجه بارداری در دو گروه مورد بررسی

گروه	نتیجه حاملگی		جمع کل
	مثبت (+)	منفی (-)	
DET	۲۶	۵۲	۷۸
	٪۳۳/۳	٪۶۶/۷	٪۱۰۰
SET	۲۲	۴۴	۶۶
	٪۳۳/۳	٪۶۶/۷	٪۱۰۰

$$P \text{ Value} = 1.000$$

در گروه DET از ۷۸ بیمار، ۱۲ بیمار بالای ۳۵ سال و ۶۶ بیمار زیر ۳۵ سال سن داشتند. از ۱۲ بیمار بالای ۳۵ سال تنها ۲ بیمار (۱۶/۷٪) حاملگی مثبت و از ۶۶ بیمار زیر ۳۵ سال، ۲۴ بیمار (۳۶/۴٪) حاملگی مثبت داشتند. اختلاف آماری معنی دار نیست (جدول ۲).

جدول ۲: توزیع فراوانی نتیجه حاملگی بر حسب سن زن در گروه DET

نتیجه حاملگی	بالای ۳۵ سال	زیر ۳۵ سال	جمع کل
مثبت	۱	۲۱	۲۲
منفی	۹	۳۵	۴۴
جمع کل	۱۰	۵۶	۶۶

و در نتایج به دست آمده اثبات شده است که در زنان با سابقه چند بار شکست IVF، میزان On-going Pregnancy در گروه DET بیشتر بوده است. علیرغم اینکه Pregnancy Rate در سه گروه مشابه بوده و همچنین میزان حاملگی چند قلوبی در گروه DET نسبت به دو گروه دیگر کمتر و میزان ابطال سیکل و سقط نسبت به SET کمتر می‌باشد^(۱۴). در حمایت از تحقیقات فوق آنچه که مسلم و قطعی می‌باشد این است که جنین می‌تواند با مکانیسمهای مختلفی بر میزان پذیرش آندومتر انسان تأثیر گذارد^(۱۲). برای مثال اثبات شده که بلاستوسیت‌های انسانی در مقایسه با جنین هایی که رشد آنها متوقف شده است می‌توانند سبب افزایش انتخابی انٹیگرین B3 به کمک سیستم اینترلوکین جنین در سلولهای اپی تلیالی آندومتر انسانی میشود^(۱۰،۱۱). در این تحقیق میزان حاملگی در دو گروه مشابه بود. نتیجه حاملگی مثبت در ۳۳/۳٪ از ۷۸ بیمار در گروه DET و همین میزان حاملگی (۳۳/۳٪) در ۶۶ بیمار گروه SET مشاهده شد.

در هیچ یک از دو گروه رابطه معنی دار آماری بین نتیجه حاملگی با روش آزمایشگاهی و نتیجه حاملگی با تعداد جنین منتقل شده به دست نیامد.

بین نتیجه حاملگی با سن زن در هر دو گروه تفاوت معنی دار آماری وجود نداشت. در گروه DET از ۱۲ زن که سن بالای ۳۵ سال داشتند نتیجه حاملگی در ۲ زن (۱۶/۷٪) مثبت بود و در گروه SET از ۱۰ زن با سن بالای ۳۵ سال، تنها یک مورد (۱۰٪) نتیجه حاملگی مثبت داشت. این اختلاف از نظر آماری معنی دار نمی‌باشد که به نظر می‌رسد مربوط به تعداد کم نمونه باشد و شاید با داشتن تعداد نمونه بیشتر تفاوت معنی داری به دست آید و بتوان گفت انتقال جنین دو مرحله ای در زنان بالای ۴۵ سال شانس حاملگی را افزایش می‌دهد.

به لحاظ تعداد کم نمونه جهت فرضیه اولیه تحقیق احتیاج به انجام کار در موارد بیشتری می‌باشد که در آینده این کار صورت خواهد گرفت.

نتیجه گیری

۱- با توجه به اینکه در این مطالعه نتیجه حاملگی در دو گروه مشابه بود، نمی‌توان گفت که روش انتقال دو مرحله ای در افزایش میزان حاملگی مؤثر بوده است.

۲- با در نظر گرفتن اینکه نتیجه حاملگی در زنان بالای ۳۵ سال گروه DET حدوداً ۱/۵ برابر نتیجه حاملگی در زنان بالای ۳۵ سال گروه SET می‌باشد، هر چند از نظر آماری معنی دار نیست ولی شاید با انجام مطالعات دیگر و داشتن تعداد نمونه بیشتر بتوان نشان داد که انتقال جنین دو مرحله ای در زنان بالای ۳۵ سال با میزان حاملگی بیشتری همراه است.

سپاسگزاری

از خانم‌ها افسانه کرمانی نژاد و خدیجه خادم الحسینی که در جمع‌آوری اطلاعات این پژوهش زحمات فوق العاده کشیده اند سپاسگزاری می‌شود.

در گروه DET، در ۲۶ بیماری که حاملگی مثبت داشتند، میانگین تعداد امبریو ۶/۲۶ و در ۵۲ بیماری که نتیجه حاملگی آنها منفی بود میانگین تعداد امبریو ۶/۰۷ بدست آمد و تفاوت آماری معنی دار نبود (جدول ۴).

در گروه SET، در ۲۲ نفر بیماری که حامله شدند و ۴۴ بیماری که حاملگی نداشتند، میانگین تعداد امبریو به ترتیب ۵/۴ و ۲/۸ بود که اختلاف آماری معنی داری بین دو گروه وجود نداشت (جدول ۵).

جدول ۴: نتیجه حاملگی بر حسب میانگین تعداد امبریو در گروه DET

نتیجه حاملگی	تعداد	میانگین ن	انحراف معیار	نتیجه تست آماری
مثبت	۲۶	۶/۲۶	۰/۷۲	T = ۷۷۶
منفی	۵۲	۶/۰۷	۱/۱۵	P.V = ۰/۴۴

بین نتیجه حاملگی و سن زن در هر دو گروه تفاوت معنی داری وجود نداشت.

جدول ۵: نتیجه حاملگی بر حسب میانگین تعداد امبریو در گروه SET

نتیجه حاملگی	تعداد	میانگین ن	انحراف معیار	نتیجه تست آماری
مثبت	۲۲	۵/۴	۷/۷	T = ۰/۳۶
منفی	۴۴	۲/۸	۰/۹۹	P.V = ۱/۱۷

بین نتیجه حاملگی و تعداد جنین منتقل شده در هر دو گروه تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

بحث

همانطور که در مقدمه عنوان شد، یکی از راهکارهای افزایش باروری در سیکلهای ART، بهبود واکنش پذیرش جنین توسط آندومتر است که با توجه به اثبات اثرات بیولوژیک تحریک و تسهیل کننده جنین بر روی آندومتر، اولیوسن با Goto و همکاران در ژاپن نتایج تحقیقی را مبنی بر انتقال جنین در دو مرحله یعنی روز دوم و روز پنجم ارایه کردند که نتایج ارایه شده توسط آنان در ۵۶ بیمار به صورت افزایش Implantation Rate, Pregnancy Rate در گروه DET نسبت به گروه SET بوده و علاوه بر این ذکر شده است که میزان حاملگی چند قلو در دو گروه تفاوتی با هم نداشته است^(۱۳). در ادامه این تحقیق در سال بعد و در همکاران کشور توسط Koichi Kyono و همکاران تحقیقی مشابه انجام شده است و سه گروه شامل: گروه اول با روش DET در روزهای ۱-۳ (مرحله اول) و روز ۵ (مرحله دوم) و گروه دوم انتقال جنین در یک مرحله در روز سوم و گروه سوم انتقال جنین در روز پنجم (انتقال بلاستوسیت) با یکدیگر مقایسه گردیده اند

References

- 1- HSU M I , Barros G , Mayer J & et al : ***Is the timing of implantation affected by zona pellucida micromanipulation ?*** J Assist Reprod Genet 2000 Jan, 17(1) ; 34-8 .
- 2- Mansour RT, Rhodes CA, Aboulghor MA & et al: ***Transfer of zona - Free embryos improves outcome in poor prognosis patients; A Pective randomized Controlled Study,*** Hum Reprod 2000 May , 15(5) : 1061- 4.
- 3- Sakkas D , ***Reflections on the number of embryos to replace at the dawn of the 21st century.*** Carr opine Obstet Gynecol 2001 Jun, 13(3) : 293-7.
- 4- Van Royen E, Mangelschots K & et al: ***Characterization of a top quality embryo, A step towards single embryo transfer.*** Hum Reprod 1999 Sep; 14(9): 2345-9.
- 5- Peter R, Brinsden: ***Optimizing implantation: Diagnostic and therapeutic considerations: Gcoffegsben and Chris to zaurvés.*** In Vitro Fertilization and assisted Reproduction- UK - Parthenon Publishing, 1999: 275-285.
- 6- Paul Devroey, Basil C - Tenlatzis & et al: ***Induction for ICSI - L Hanberger , K - Laden - Current theory and practice of ICSI - UK - Oxford University Press – 1998: 128-134.***
- 7- Veljko Vluisavljevic, Bort Kavacic & et al: ***Influence of embryo selection after ICSI on implantation after embryo transfer - ZDRAV VESTN 2002 ; 71 : Suppl,1: 7-11 .***
- 8- Omid Khorram, Sanders Shapiro & et al: ***Transfer of nonassisted hatching and hatching human blastocysts after IVF.*** Fertile Sterile 2000 Jun , Vol 74(1): 163-165.
- 9- William B, Shoolcraft MD & et al: ***Embryo Transfer: Techniques and variables affecting success.*** Fertil Steril Nov 2001, Vol 76(5):863-870 .
- 10- Zeev Shoham , Colin M Howles, Howard S Jacobs : ***The implantation process: Lessons from ART;*** Carlos Simon , Carlos Mareno - Female Infertility therapy - UK - Martin Dunitz- 1999:393-405.
- 11- Abdel Nabi, Awoniyi Awonuga & et al: ***Multiple attempts at embryo transfer; dose this affect IVF treatment outcomes?*** Hum Reprod 1997, Vol 12 (196): 1188-1190.
- 12- Andrew J, Levi MD, Michael R, Drews MD & et al: ***Controlled ovarian hyperstimulations dose not adversely affect endometrial receptivity in IVF cycles.*** Fertil Steril Oct 2001, Vol 76(40): 670-674.
- 13- S.Goto, K.Takebayashi & et al: ***Anovel method of embryo transfer in human IVF-ET based on the concept of embryo dependent of embryo receptivity: Two - step embryo transfer.*** Fertil Steril, Sep 2001, Vol 76(3), Suppl 1-5: 113.
- 14- Koichi Kyono, Noritaka Fukunaga & et al: ***Two step (day 1-3+day 5) embryo transfer improve on-going pregnancy rate in women with muetiple failures of conception after ART.*** Fertil Steril, Sep 2002, Vol 78(3), Suppl 1:5230.
- 15- Jacques Cohen, Henry E,Mather, BS.& et al: ***Zona pellucida micromanipulation and consequences for embryonic development and implantation : Jacques Cohen.*** Miceromanipulation of human Gamets and Embryos, New York, Raven Press 1992: 191-223.