

Strokovni prispevek/Professional article

MOŽNOSTI ZA PRENOS ENEGA ZARODKA V POSTOPKU ZUNAJTELESNE OPLODITVE

POSSIBILITIES FOR A SINGLE EMBRYO TRANSFER IN AN IN VITRO FERTILIZATION PROGRAMME

Irma Virant-Klun, Tomaž Tomaževič, Branko Zorn, Lili Bačer-Kermavner, Brigita Valentinčič-Gruden, Jerneja Kmecl, Martina Ribič-Pucelj, Andrej Vogler, Eda Bokal-Vrtačnik, Sašo Drobnič, Bojana Pinter, Jožica Mivšek, Helena Meden-Vrtovec

Oddelek za reprodukcijo, Ginekološka klinika, Klinični center, Šljajmerjeva 3, 1525 Ljubljana

Prispelo 2003-05-14, sprejeto 2003-06-19; ZDRAV VESTN 2003; 72: Supl. II: 113-6

Ključne besede: zunajtelesna oploditev; blastocista; prenos; zamrzovanje; odmrzovanje; nosečnost

Izvleček – Izhodišča. Ker v postopku zunajtelesne oploditve vnašamo v maternico dva zarodka – blastocisti, je delež dvoplojnih nosečnosti večji kot v splošni populaciji. Namen naše raziskave je bil ugotoviti klinične rezultate po elektivnem prenosu ene same blastociste.

Metode. Retrospektivno smo analizirali rezultate 696 postopkov zunajtelesne oploditve. Postopke smo razdelili v dve skupini: 37 postopkov, v katerih smo v maternico elektivno prenesli eno samo blastocisto (skupina 1), in 659 postopkov, v katerih smo v maternico elektivno prenesli dve blastocisti (skupina 2). Primerjali smo stopnjo zanositve, delež dvoplojnih nosečnosti in delež spontanih splavov. Ugotavljali smo vpliv metode zunajtelesne oploditve (klasični IVF in ICSI) in starosti ženske (< 38 let in > 38 let) na klinične rezultate po prenosu ene ali dveh blastocist.

Rezultati. Po prenosu ene ali dveh blastocist se stopnji nosečnosti nista statistično pomembno razlikovali (30% vs. 46%); po prenosu ene blastociste ni bilo nobene dvoplojne nosečnosti, po prenosu dveh blastocist je bilo 18% dvoplojnih nosečnosti. Metoda zunajtelesne oploditve ni vplivala na delež dvoplojnih nosečnosti po prenosu dveh blastocist, medtem ko je bil delež dvoplojnih nosečnosti pri ženskah, mlajših od 38 let, statistično pomembno večji kot pri starejših ženskah (19% vs. 6%; $p < 0,05$).

Zaključki. Klinični rezultati po elektivnem prenosu ene ali dveh blastocist so zelo primerljivi. S prenosom ene blastociste se izognemo dvoplojni nosečnosti. Elektivni prenos ene same blastociste je priporočljiv predvsem pri ženskah, mlajših od 38 let.

Uvod

Razvoj novih, zaporednih gojišč je v postopku zunajtelesne oploditve omogočil gojenje zarodkov do razvojne stopnje blastociste (1). Na naši kliniki gojimo zarodke vseh bolnic v postopku zunajtelesne oploditve do razvojne stopnje blastoci-

Key words: *in vitro fertilization; blastocyst; transfer; freezing; thawing; pregnancy*

Abstract – Background. Since in *in vitro* fertilization two embryos – blastocysts are routinely transferred, the twin pregnancy rates are higher than in the general population. The aim of our study was to evaluate the clinical results after elective single-blastocyst transfer.

Methods. Retrospectively we analysed clinical results of 696 *in vitro* fertilization cycles. The cycles were divided into 37 cycles, in which an elective single blastocyst transfer was performed (group 1), and in 659 cycles, in which an elective double blastocyst transfer was performed (group 2). The pregnancy rates, twin pregnancy rates, and spontaneous abortion rates were compared between the two groups. Additionally we evaluated the effect of the method of *in vitro* fertilization (classical IVF and ICSI) and female age (< 38 years and > 38 years) on the clinical results after a single or double blastocyst transfer.

Results. After an elective single or double blastocyst transfer, there was no statistically significant difference in pregnancy rates (30% vs. 46%); after a single blastocyst transfer there were no twin pregnancies, whereas after a double blastocyst transfer the pregnancy rate was 18%. After a double blastocyst transfer, the method of *in vitro* fertilization did not affect the twin pregnancy rate, whereas in women younger than 38 years, the twin pregnancy rate was significantly higher than in women aged > 38 years (19% vs. 6%; $p < 0,05$).

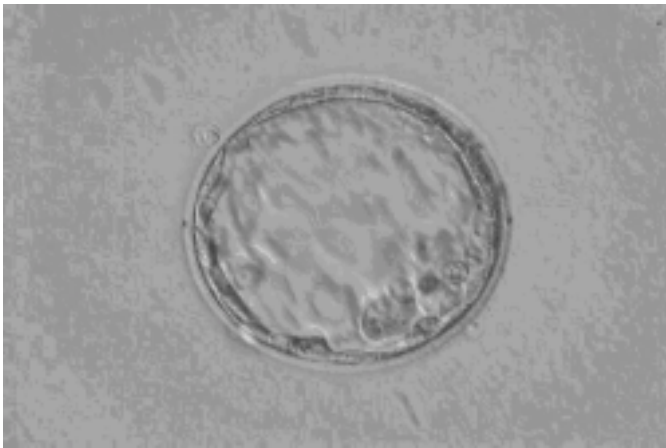
Conclusions. Clinical results obtained after an elective single and double blastocyst transfer are comparable. By the transfer of one blastocyst twin pregnancies are avoided. Elective single blastocyst transfer is recommended in women, younger than 38 years.

ste. Zarodki na razvojni stopnji blastociste imajo približno 100 celic in so že diferencirani v embrioblast in trofoblast, vmesni prostor pa zapolnjuje kavitacijska votlina – blastocel (sl. 1). Do razvojne stopnje blastociste se razvije približno 60% zarodkov. Na 5. dan po ultrazvočnem aspiriranju foliklov vne-

semo v maternico največ dva zarodka - blastocisti. Poleg tega smo razvili klinično uspešni metodi za zamrzovanje in odmrzovanje nadštevilnih humanih blastocist (2), ki v postopku zunajtelesne oploditve preostanejo po vnosu svežih blastocist v maternico. Postopek zamrzovanja in odmrzovanja preživi približno 85% blastocist, vnos odmrznjenih blastocist v maternico pa daje dobre klinične rezultate (3).

Ker z razvojem zarodkov do razvojne stopnje blastociste izberemo najkakovostnejše zarodke za vnos v maternico in nadštevilne blastociste uspešno zamrznemo, nam to daje možnosti za prenos ene same blastociste v maternico, ne da bi s tem zmanjšali klinično uspešnost postopka. Na ta način bi se izognili dvoploдным nosečnostim, ki se v postopku zunajtelesne oploditve pojavljajo v višjem odstotku kot v splošni populaciji (4).

Namen naše raziskave je bil ugotoviti klinične rezultate po prenosu ene same blastociste v maternico v postopku zunajtelesne oploditve in se s tem približati naravnemu stanju - enoplodni nosečnosti.



Sl. 1. Humana blastocista v postopku zunajtelesne oploditve (400-kratna povečava; Laboratorij IVF, Ginekološka klinika, Klinični center Ljubljana).

Figure 1. Human blastocyst in an in vitro fertilization programme ($\times 400$; IVF Laboratory, Department of Obstetrics and Gynecology, University Medical Centre Ljubljana).

Metode

Retrospektivno smo analizirali klinične rezultate 696 postopkov zunajtelesne oploditve s prenosom zarodka, opravljenih na Ginekološki kliniki v Ljubljani v obdobju od januarja 2001 do decembra 2002. Postopke smo razdelili v dve skupini: 37 postopkov, v katerih smo pri neplodnih parih pridobili več kot en zarodek, vendar smo v maternico prenesli eno samo blastocisto - elektivni prenos ene same blastociste (skupina 1) in 659 postopkov, v katerih smo pridobili več kot dva zarodka, vendar smo v maternico prenesli samo dve blastocisti - elektivni prenos dveh blastocist (skupina 2). V skupini 1 smo elektivno prenesli eno samo blastocisto zaradi želje bolnice, nevarnosti hiperstimulacije, dvoploodne nosečnosti ali zaradi ponavljajočih se spontanah splavov v anamnezi. V skupini 2 smo rutinsko prenesli v maternico dve blastocisti, saj v postopku zunajtelesne oploditve prenesemo največ 2 zarodka. V obeh skupinah smo upoštevali tudi zamrzovanje in odmrzovanje blastocist ter klinične rezultate z odmrznjenimi blastocistami iz istih postopkov zunajtelesne oploditve. S testom Mann Whitney U (program SPSS, Illinois Inc., USA) smo ugotavljali statistično razliko med obema skupinama po stopnji zanositve, kumulativni stopnji zanositve (vključujoč

zanositve po vnosu zamrznjenih in odmrznjenih blastocist iz istih postopkov), deležu dvoploдных nosečnosti in deležu spontanah splavov. Razlike so bile statistično pomembne pri $p < 0,05$.

Rezultati

Elektivni prenos ene same ali dveh blastocist smo izvedli v 696 od 2123 (33%) postopkov zunajtelesne oploditve v obdobju od januarja 2001 do decembra 2002. Obe skupini, skupina z elektivnim prenosom ene same blastociste in skupina z elektivnim prenosom dveh blastocist, se nista razlikovali v povprečni starosti ženske, povprečnem številu zarodkov na postopek in po deležu postopkov neposrednega vnosa semenčice v citoplazmo jajčne celice (ICSI) za zdravljenje moške neplodnosti (razpr. 1), zato sta bili primerljivi. V obeh skupinah smo dosegli skupno 314 nosečnosti, kar pomeni 45-odstotno stopnjo nosečnosti na prenos zarodka.

Razpr. 1. *Klinični rezultati po elektivnem prenosu ene ali dveh blastocist v postopku zunajtelesne oploditve.*

Table 1. *Clinical results after elective single and double blastocyst transfer in an in vitro fertilization programme.*

	Zunajtelesna oploditev In vitro fertilization	
	Elektivni prenos 1 blastociste v maternico (skupina 1) Elective single blastocyst transfer (group 1)	Elektivni prenos 2 blastocist v maternico (skupina 2) Elective double blastocyst transfer (group 2)
Prenosi zarodkov v maternico (ET) Embryo transfers (ET)	37	659
Število žensk No. of women	37	615
Povprečna starost ženske (min-max) Mean female age (min-max)	32,9 \pm 2,3 (29-36)	33,5 \pm 4,5 (20-43)
Število zarodkov/postopek (min-max) No. of embryos per cycle (min-max)	2,8 \pm 0,8 (2-4)	5,3 \pm 2,4 (3-19)
Postopki neposrednega vnosa semenčice v citoplazmo jajčne celice ICSI (%) Cycles of intracytoplasmic sperm injection ICSI (%)	12 (32)	227 (34)
Klinične nosečnosti Clinical pregnancies	11	303
Klinične nosečnosti/ET Clinical pregnancies/ET	30%	46%
Dvoploodne nosečnosti (%) Twin pregnancies (%)	0 (0) ^{sa}	51 (17) ^{sb}
Spontani splavi (%) Spontaneous abortions (%)	2 (18)	33 (11)
Postopki z zamrzovanjem blastocist (%) Cycles with blastocyst freezing (%)	21 (57)	367 (56)
Klinične nosečnosti z odmrznjenimi blastocistami Clinical pregnancies with thawed blastocysts	2	32
Kumulativna stopnja nosečnosti/ET Cumulative pregnancy rate/ET	13/37 (35%)* ^c	335/659 (51%)* ^d

* a, b / c, d - statistično pomembna razlika ($p < 0,05$).

- statistically significant difference ($p < 0,05$).

Stopnja nosečnosti na prenos ene blastociste (30%) se ni statistično pomembno razlikovala od stopnje nosečnosti na prenos dveh blastocist (46%). Po prenosu ene blastociste ni bilo

nobene dvoplodne nosečnosti, po prenosu dveh blastocit pa je bilo 51 (18%) dvoplojnih nosečnosti ($p < 0,05$).

Nadštevilne blastociste smo zamrznili v 388 (56%) postopkih s prenosom zarodka. Odmrznili smo blastociste iz 187 (48%) postopkov z zamrzovanjem blastocist. Pri tem smo dosegli 34 nosečnosti. Ob upoštevanju prenosa svežih in odmrznjenih blastocist iz istih postopkov smo v obeh skupinah ugotovili 50-odstotno kumulativno stopnjo nosečnosti; po elektivnem prenosu dveh blastocist smo dosegli statistično pomembno višjo kumulativno stopnjo nosečnosti (51%) kot po elektivnem prenosu ene blastociste (35%), vendar številke niso dokončne, saj so blastociste iz 52% postopkov z zamrzovanjem blastocist še vedno zamrznjene.

Vpliv metode zunajtelesne oploditve na klinične rezultate po elektivnem prenosu ene same ali dveh blastocist

Elektivno smo eno blastocisto prenesli po 25 postopkih klasične zunajtelesne oploditve (IVF) in 12 postopkih neposrednega vnosa semenčice v citoplazmo jajčne celice (ICSI). Po IVF smo dosegli 8 nosečnosti (32-odstotna stopnja nosečnosti na prenos zarodka), po ICSI pa 3 nosečnosti (25-odstotna stopnja nosečnosti na prenos zarodka). Razlika v stopnji nosečnosti na prenos zarodka ni bila statistično pomembna.

Elektivni prenos 2 blastocist smo opravili po 432 postopkih IVF in 227 postopkih ICSI. Po postopkih IVF smo dosegli 200 nosečnosti, po postopkih ICSI pa 103 nosečnosti. Po postopkih IVF in ICSI se stopnja nosečnosti na prenos zarodka ni razlikovala (46% proti 45%). Po IVF je bilo 37 (19%) dvoplojnih nosečnosti in po ICSI 14 (14%). Delež dvoplojnih nosečnosti po IVF in ICSI se ni statistično pomembno razlikoval.

Vpliv starosti ženske na klinične rezultate po elektivnem prenosu ene same ali dveh blastocist

Eno samo blastocisto smo prenesli v 17 postopkih pri 17 ženskah, mlajših od 38 let, in v dveh postopkih pri dveh ženskah, starejših od 38 let. Pri mlajših ženskah smo dosegli 10 nosečnosti, pri starejših ženskah pa 1 nosečnost. Stopnja nosečnosti na prenos zarodka pri mlajših in starejših ženskah se ni razlikovala (59% vs. 50%).

Dve blastocisti smo prenesli po 522 postopkih zunajtelesne oploditve pri ženskah, mlajših od 38 let, in po 137 postopkih pri ženskah, starih 38 let ali več. Pri mlajših ženskah smo dosegli 253 nosečnosti (48-odstotna stopnja nosečnosti na prenos zarodka) in pri starejših ženskah 50 nosečnosti (36-odstotna stopnja nosečnosti na prenos zarodka). Pri mlajših ženskah je bilo 48 (19%) dvoplojnih nosečnosti, medtem ko so bile pri starejših ženskah le 3 (6%) mnogoplodne nosečnosti. Pri ženskah, mlajših od 38 let, je bil delež mnogoplojnih nosečnosti statistično pomembno manjši kot pri starejših ženskah ($p < 0,05$).

Razpravljanje

Po elektivnem prenosu ene same blastociste v maternico je bila stopnja nosečnosti dobra in primerljiva stopnji nosečnosti po prenosu dveh blastocist v maternico. Po vnosu ene same blastociste v maternico ni bilo nobene dvoplodne nosečnosti, medtem ko je bilo po vnosu dveh blastocist 18% dvoplojnih nosečnosti.

Po elektivnem prenosu ene same blastociste v maternico smo dosegli 30-odstotno stopnjo nosečnosti na prenos zarodka, kar je dober klinični rezultat. V preteklosti smo zarodke gojili le 2 dni do razvojne stopnje manjceličnika z 2 do 4 celicami. Stopnje nosečnosti, ki smo jih dosegali s prenosom dveh, treh ali celo štirih manjceličnikov, so bile nižje (5, 6). To potrjuje, da razvoj zarodkov do razvojne stopnje blastociste omogoča izbor najbolj kakovostnih zarodkov za prenos v maternico, in

da z elektivnim prenosom ene blastociste v maternico ne zmanjšamo možnosti za zanositev. Zarodki z nekaterimi večjimi genetskimi in presnovnimi nepravilnostmi se namreč ne razvijejo do razvojne stopnje blastociste.

Po elektivnem prenosu ene blastociste v maternico ni bilo dvoplojnih nosečnosti. Nekateri avtorji so poročali o povečani možnosti za pojav monozigotnih dvojčkov po prenosu blastocist po postopku zunajtelesne oploditve (7), vendar v naši študiji po vnosu ene blastociste tako po IVF kot po ICSI ni moogo ugotovili nobene monozigotne dvoplojne nosečnosti.

Dejstvo, da po prenosu ene same blastociste v maternico ni dvoplojnih nosečnosti, je izredno pomembno, saj je dvoplojna nosečnost povezana z več zapleti med nosečnostjo in porodom, predvsem pa s prezgodnjim porodom in razvojnimi nepravilnostmi pri novorojenčkih (4, 8).

Po elektivnem prenosu dveh blastocist smo dosegli 46-odstotno stopnjo nosečnosti na prenos zarodka, ki se ni statistično pomembno razlikovala od stopnje nosečnosti po prenosu ene blastociste. Po prenosu dveh blastocist smo ugotovili 18% dvoplojnih nosečnosti. To je več kot v splošni populaciji, kjer se pojavlja približno 3 do 40 dvoplojnih nosečnosti na 1000 nosečnosti (4).

Metoda zunajtelesne oploditve ne vpliva na delež dvoplojnih nosečnosti po prenosu dveh blastocist. Čeprav se po metodi ICSI do blastociste razvije manjši delež zarodkov kot po klasičnem IVF (9, 10), je kakovost blastocist po metodi ICSI povsem enakovredna kakovosti blastocist po klasičnem IVF. Zato je bil tudi delež dvoplojnih nosečnosti enak. To kaže na to, da je elektivni prenos ene blastociste smiselni tako po IVF kot po ICSI.

Pri ženskah, mlajših od 38 let, je bil delež dvoplojnih nosečnosti po prenosu dveh blastocist manjši kot pri ženskah, starih 38 let ali več. To je razumljivo, saj je vgnezditev sposobnost zarodkov pri starejših ženskah manjša; glavni vzrok temu je predvsem slabša kakovost jajčnih celic. Genetska preiskava primarnega in sekundarnega polarnega telesca z metodo fluorescenčne hibridizacije *in situ* (FISH; kromosomi 13, 16, 18, 21, 22) je na 8382 jajčnih celicah starejših žensk (s povprečno starostjo 38,5 leta) v postopku zunajtelesne oploditve pokazala, da se pri več kot polovici jajčnih celic pojavlja nepravilno število kromosomov – aneuploidije (11). Pri ženskah, starejših od 38 let, imajo celice granulozne v večji meri nepravilno mitohondrijsko DNK (predvsem delecije) kot pri ženskah, starih 34 let ali manj (12). S starostjo ženske se slabša kakovost zarodkov – predvsem se večja pojavnost aneuploidij (13), kar ima za posledico manjšo vgnezditevno sposobnost zarodkov. Zato je elektivni prenos ene same blastociste priporočljiv predvsem pri ženskah, mlajših od 38 let. Pri starejših ženskah bi s prenosom ene same blastociste v maternico preveč zmanjšali možnosti za zanositev. Zato bo pri odločanju za elektivni prenos ene blastociste pri teh bolnicah odločilnega pomena predvsem raven FSH (14).

Elektivni prenos ene same blastociste v maternico je zelo perspektiven, predvsem pri mlajših ženskah. Omogoča dobre klinične rezultate brez dvoplojnih nosečnosti. Prenos ene same blastociste v maternico omogoča uspešen program zamrzovanja in odmrzovanja humanih blastocist (2, 3). Nadštevilne blastociste lahko uspešno zamrznemo in odmrzemo.

Stopnja zanositve po elektivnem prenosu ene same blastociste v maternico se bo v prihodnosti še povečala, saj znanje o humanih blastocistih hitro napreduje. Spoznanja kažejo, da se predvsem povsem razvite blastociste in blastociste z dobro morfologijo (15) bolje vgnezdijo v maternici kot manj razvite blastociste in blastociste s slabšo morfologijo. Prenos ene same blastociste v maternico bo primeren predvsem za ženske s povsem razvitimi blastocistami in blastocistami z dobro morfologijo. Na kakovost in vgnezditevno sposobnost blastociste pa lahko sklepamo tudi iz morfologije primarnega telesca jajčne celice (16), morfologije pronukleusov v zigoti (17) in iz

kakovosti zarodka na dan 2 (18). Kot zelo perspektivno pa se kaže tudi ugotavljanje metabolizma blastocist: porabe glukoze iz gojišča, v katerem se razvija blastocista (19), ali porabe in sproščanja amino kislin v gojišče (20). Za prenos v maternico bomo lahko izbrali najbolj vitalno (metabolno aktivno) blastocisto, preostale blastociste pa zamrznili.

Zaključki

Elektivni prenos ene blastociste v maternico daje dobre klinične rezultate, zelo primerljive elektivnemu prenosu dveh blastocist. S prenosom ene blastociste se izognemo dvoplodni nosečnosti. Elektivni prenos ene blastociste je priporočljiv ne glede na metodo zunajtelesne oploditve (IVF ali ICSI), predvsem pa pri ženskah, mlajših od 38 let. Stopnja zanositve po elektivnem prenosu ene same blastociste v maternico se bo v prihodnosti še povečala. Znanje o humanih blastocistah hitro napreduje, tako da bomo lahko za prenos v maternico izbrali blastocisto najboljše kakovosti, preostale pa zamrznili.

Zahvala

Zahvaljujemo se gospe Mojci Pirc, vodji Enote za raziskovalno delo, za pregled in oblikovanje besedila. Prav tako se zahvaljujemo medicinskim sestram: Ani Kisel-Vovko, Zvonki Gorše, Janji Tekavec, Jožici Šimonka, Majdi Štucin, Andreji Peterlin, Blanki Gradišek, Zdenki Mramor in Gini Milič za vso skrb in pomoč pri postopkih zunajtelesne oploditve.

Literatura

- Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod* 2000; 15: Suppl 6: 9-23.
- Virant-Klun I, Tomažević T, Bačar-Kermavner L, Valentinčič-Gruden B, Mivšek J, Meden-Vrtovec H. Successful freezing and thawing of blastocysts cultured in sequential media. *Fertil Steril* 2003; 6, v tisku.
- Virant-Klun I, Veble A, Valentinčič B et al. Zamrzovanje in odmrzovanje zarodkov v programu zunajtelesne oploditve. *Zdrav Vestn* 1998; 67: 495-9.
- Peterson B, Blair E, Watson L, Stanley F. Adverse outcome after multiple pregnancy. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1998; 12: 1-17.
- Tomažević T, Meden-Vrtovec H, Ribič-Pucelj M et al. Po desetih letih IVF-ET na Ginekološki kliniki v Ljubljani. *Zdrav Vestn* 1994; 63: 579-83.
- Meden-Vrtovec H, Virant-Klun I, Tomažević T et al. Program zunajtelesne oploditve na Ginekološki kliniki v Ljubljani. *Zdrav Vestn* 2001; 70: 89-95.
- Mikli AA, Jun SH, Hinckley MD, Behr B, Giudice LC, Westphal LM. Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer. *Fertil Steril* 2003; 79: 503-6.
- Chuileannain FN, Brennecke S. Prediction of preterm labour in multiple pregnancies. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1998; 12: 53-66.
- Shoukir Y, Didier C, Campana A, Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum Reprod* 1998; 13: 1632-7.
- Griffiths TA, Murdoch AP, Herbert M. Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure. *Hum Reprod* 2000; 15: 1592-6.
- Kuliev A, Cieslak J, Ilkevitch Y, Verlinsky Y. Chromosomal abnormalities in a series of 6733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 54-9.
- Seifer DB, DeJesus V, Hubbard K. Mitochondrial deletions in luteinized granulosa cells as a function of age in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002; 78: 1046-8.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trobetta C, Boudjema E. The role of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 2002; 4: Suppl 3: 31-6.
- Van Rooij IA, Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003; 79: 489-90.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000; 73: 1155-8.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pflieger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod* 2002; 17: 2415-8.
- Balaban B, Urman B, Isiklar A et al. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2357-61.
- Hardarson T, Caisander G, Sjogren A, Hanson C, Hamberger L, Lundin K. A morphological and chromosomal study of blastocysts developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared with control blastocysts. *Hum Reprod* 2003; 18: 399-407.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 2001; 76: 1175-80.
- Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2002; 17: 999-1005.