

KẾT QUẢ HỖ TRỢ THOÁT MÀNG TRONG CÁC CHU KỲ CHUYỂN PHÔI RÃ ĐÔNG THỤ TINH TRONG ỒNG NGHIỆM

Nguyễn Thị Tâm An, Lê Minh Tâm, Cao Ngọc Thành
Trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Kỹ thuật hỗ trợ thoát màng (AH) cho phôi trong thụ tinh ống nghiệm dựa trên giả thuyết việc tạo ra một lỗ nhân tạo trên màng thấu quang (ZP) có thể giúp cho tiến trình thoát màng của phôi dễ dàng hơn. Kỹ thuật này giúp tăng tỷ lệ làm tổ và có thai ở phụ nữ lớn tuổi, ở người thất bại làm tổ liên tiếp và trong các chu kỳ chuyển phôi trữ. Nghiên cứu này mô tả kết quả chuyển phôi rã đông với sự hỗ trợ của kỹ thuật hỗ trợ thoát màng bằng tia laser (LAH), một trong những phương pháp được xem là có tính an toàn cao nhất hiện nay. **Mục tiêu:** Đánh giá hiệu quả của kỹ thuật hỗ trợ thoát màng đến kết quả có thai của các chu kỳ chuyển phôi trữ. **Phương pháp:** 65 chu kỳ với 153 phôi được rã đông được tiến hành trong 12 tháng, hỗ trợ thoát màng cho phôi bằng phương pháp làm mỏng ¼ chu vi của màng thấu quang. Phôi ngày 3 được nuôi cấy qua đêm, bệnh nhân được chuẩn bị nội mạc và chuyển phôi thuận lợi. **Kết quả:** Tỷ lệ sống của phôi sau rã là 93,4% (143 phôi), trong đó phôi tốt loại G1 chiếm 55,9%, G2 chiếm 29,3% và tiến hành LAH trước khi chuyển phôi. Với số phôi chuyển trung bình $2,4 \pm 0,8$, tỷ lệ làm tổ/số phôi chuyển 19,5% và trên số chu kỳ chuyển phôi là 43,1%. Tỷ lệ có thai lâm sàng tính trên chu kỳ chuyển phôi chiếm 33,8% với tỷ lệ sẩy thai sớm (thai sinh hóa và thai lâm sàng sẩy sớm) chiếm 12,3%. Tỷ lệ thai diễn tiến chiếm 30,8% và đặc biệt tỷ lệ đa thai thấp (chiếm 18,2%). Các kết quả này tương đương hoặc tốt hơn khi so sánh với các nghiên cứu khác chuyển phôi có hoặc không hỗ trợ thoát màng. **Kết luận:** LAH góp phần đảm bảo ổn định hiệu quả trong các chu kỳ chuyển phôi rã đông.

Từ khóa: Hỗ trợ phôi thoát màng, chuyển phôi trữ, màng thấu quang

Abstract

THE EFFECT OF ASSISTED HATCHING IN FROZEN-THAWED EMBRYO TRANSFER CYCLES

Nguyen Thi Tam An, Le Minh Tam, Cao Ngọc Thành
Hue University of Medicine and Pharmacy

Background: Laser assisted hatching technique based on the hypothesis to make an artificial hole on zona pellucida (ZP) that can help embryo hatching out of ZP easily. This technique has been shown to increase implantation and pregnancy rates in women of advanced age, in women with recurrent implantation failure and following the transfer of frozen-thawed embryos. This study described the outcome of frozen-thawed embryo transfers with laser assisted hatching (LAH), which is one of the safest method in nowadays. **Purpose:** To assess the effect of assisted hatching technique on the clinical outcomes in vitrified-warmed transfer cycles. **Method:** A total of 65 thawed-transfer cycles with 153 thawed-embryos undertaken within a 12-month period were analysed, Assisted hatching with laser zona thinning was performed with one-quarter of the zona pellucida circumference. The overall thawed-embryos (day 3) were kept in culture overnight. Patient were prepared the suitable endometrium and transferred embryos advantageously. **Results:** In which, having the rate of survival embryos were 143 occupying 94.3%, the percentage of grade 1 and 2 embryos occupied 55.9% and 29.3% respectively, and that were enrolled LAH before transferring of frozen-thawed embryos. The average transferred embryos were 2.4 ± 0.8 , The rate of implantation per transferred embryos and per transferred embryos cycles was 19.5% and 43.1% respectively. The rate of clinical pregnancies per embryo transfer cycles occupied 33.8% with percentage of early miscarriages (biochemical pregnancies and early clinical miscarriages) was 12.3%. The rate of ongoing pregnancies was 30.8% and multiple pregnancies was low just 12.3%. This result was equal or higher than other researchs in embryos transfer had or no LAH. **Conclusion:** LAH contributed to stable frozen-thawed embryos transfer effectiveness.

Key words: Laser assisted hatching, frozen-thawed embryos transfer, zona pellucida (ZP)

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kỹ thuật hỗ trợ sinh sản đã giúp tạo ra nhiều phôi trong chu kỳ có kích thích buồng trứng và các phôi dư có thể được trữ lạnh để chuyển cho bệnh nhân trong các chu kỳ khác, gia tăng cơ hội có thai trong thụ tinh ống nghiệm (IVF/ICSI). Tuy nhiên hiệu quả của chu kỳ chuyển phôi trữ lạnh vẫn bị giới hạn do một số khó khăn tồn tại trong quá trình trữ lạnh – rã đông khiến cho màng thấu quang (ZP) trở nên cứng lại, đặc biệt tính đàn hồi và độ mỏng của màng đều bị ảnh hưởng khi tuổi mẹ cao, bản thân điều kiện nuôi cấy trong ống nghiệm cũng có thể góp phần ảnh hưởng đến khả năng thoát màng (Carroll và cs, 1990; Cohen, 1991; Tucker và cs, 1991).

Để có thể bám vào nội mạc tử cung, làm tổ và phát triển, phôi giai đoạn phôi nang cần thoát ra khỏi màng ZP, thường vào khoảng ngày 6 sau thụ tinh. Thoát màng xảy ra do sự tăng áp suất bên trong (tác động chủ yếu) cộng với tác động enzyme (lysine) ở tử cung và phôi tiết ra. Tuy nhiên trong quá trình nuôi cấy ống nghiệm hay trữ lạnh, khả năng thoát màng phôi có thể bị ảnh hưởng dẫn tới làm cứng hoặc làm dày màng ZP. Vì thế, kỹ thuật hỗ trợ thoát màng sẽ có ích trong việc tăng khả năng làm tổ vào niêm mạc tử cung (Cohen, 1990, 1992). Một số kỹ thuật hỗ trợ thoát màng khác nhau được áp dụng như thoát màng bằng dung dịch acid tyrode, tách một phần màng ZP và sử dụng laser (Pelin kuntlu, Ozhan atvar, 2010). Mục đích chính của các phương pháp này đều dựa trên nguyên tắc là tạo một lỗ hay là làm mỏng để tạo điều kiện thuận lợi cho sự thoát màng của phôi. Một số nghiên cứu cho thấy sử dụng tia laser dường như là ít xâm lấn và an toàn hơn so với sử dụng dung dịch acid Tyrode (Balaban, 2002; Hsieh Y, 2002).

Chính vì các lý do này, chúng tôi đã áp dụng kỹ thuật hỗ trợ phôi thoát màng trong các chu kỳ chuyển phôi rã đông bằng kỹ thuật bào mỏng nhờ tia laser. Nghiên cứu này nhằm mục đích hồi cứu kết quả các chu kỳ chuyển phôi có áp dụng kỹ thuật hỗ trợ thoát màng và so sánh với kết quả của các nghiên cứu khác.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng: Những trường hợp có chỉ định chuyển phôi rã đông sau khi thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm tại Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô Sinh, Bệnh viện Đại học Y Dược Huế trong thời gian từ tháng 12/2013 – tháng 11/2014. Tổng cộng có 65 chu kỳ với 153 phôi được rã đông và nuôi cấy tiếp qua đêm trước khi chuyển vào buồng tử cung.

Nghiên cứu theo phương pháp phân tích hồi cứu mô tả cắt ngang.

2.2. Vật liệu nghiên cứu và các bước tiến hành:

Chuẩn bị nội mạc tử cung: vào ngày 2 của chu kỳ chuyển phôi trữ người vợ được siêu âm kiểm tra tử cung, buồng trứng và chỉ định phác đồ chuẩn bị nội mạc với estradiol (E2) dạng viên (Cyclo-Progynova, Schering AG, Istanbul, Turkey) liều 2mg x 4 viên/ngày. Theo dõi siêu âm đến khi nội mạc đạt ít nhất 8mm và hình thái 3 đường (dạng hạt cà phê) thì cho chuyển dạng nội mạc với progesterone (Crinone 8% (progesterone gel) bơm âm đạo 2 ống/ngày). Thời điểm chuyển phôi được tính từ ngày bắt đầu cho progesterone cộng thêm 4 ngày. Sau khi chuyển phôi sử dụng tiếp tục progynova 2mg x 2 viên/ngày và Crinone 8% x 2 ống/ngày trong 2 tuần trước khi kiểm tra beta-hCG. Các phôi được rã vào ngày 3 và được nuôi cấy qua đêm. Đánh giá phôi ngày 3 theo tiêu chuẩn Scott, 2003 gồm phôi độ 1 (G1): phôi 8 tế bào, <10% mảnh vỡ; phôi độ 2 (G2): phôi 8 tế bào, 10-20% mảnh vỡ, phôi độ 3 (G3): phôi 6-7 tế bào, >20% mảnh vỡ, các phôi bào không đều nhau, phôi độ 4 (G4): 4-6 tế bào với trên 20% mảnh vỡ, phôi bào không đều nhau. Phôi trước khi chuyển được đánh giá lại và đạt đến giai đoạn phôi dâu (ngày 4).

Quy trình trữ lạnh và rã đông phôi: Phôi được trữ là phôi ngày 3, có chất lượng tốt (G1 và G2), được trữ lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa. Chúng tôi sử dụng bộ môi trường đông lạnh và rã đông Kitazato, Nhật kết hợp với dụng cụ chứa cryotop (Kitazato, Nhật). Phôi trữ được cho tiếp xúc với môi trường cân bằng và môi trường thủy tinh hóa trước khi đặt lên cryotop và nhanh chóng nhúng trực tiếp cryotop chứa phôi vào Nitơ lỏng. Thaw-kit (Kitazato, Nhật) được sử dụng cho quy trình rã đông phôi. Tất cả dụng cụ và hóa chất trước khi tiến hành rã đông đều đặt ở nhiệt độ phòng, thực hiện theo hướng dẫn của Kitazato. Những phôi sống được tiến hành AH trước khi chuyển vào tử cung. Phôi trữ rã được xem như là còn sống với tỷ lệ 50% các phôi bào còn nguyên vẹn, hoặc có ít nhất 3 phôi bào còn sống hay 1 phôi bào đang phân chia sau khi rã (Rienzi, 2002).

Môi trường nuôi cấy phôi sau rã đông: môi trường G-2TM Plus (Vitrolife, Gotheburg, Sweden) được sử dụng cho nuôi cấy phôi rã đông. Phôi ngày 3 được tiến hành nuôi cấy qua đêm.

Hỗ trợ thoát màng cho phôi bằng phương pháp làm mỏng: phôi được chọn đặt trong các giọt môi trường G2 (Vitrolife, Sweden). Sử dụng tia laser từ hệ thống Saturn 5 Active, làm mỏng màng ZP với độ dài 30-40µm và rộng khoảng 50% chiều dày của

màng. Sau đó phôi được ngâm trong môi trường Embryo Glue (Vitrolife, Sweden) từ 15-30 phút trước khi chuyển vào buồng tử cung.

Các biến nghiên cứu được khảo sát bao gồm đặc điểm bệnh nhân, đặc điểm phôi sau rã đông, màng ZP và kết quả chu kỳ chuyển phôi rã đông.

Số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm SPSS

19.0 với độ tin cậy 95% ($p > 0,05$).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Tổng số 65 trường hợp tham gia vào nghiên cứu với tổng số 153 phôi được rã đông. Các dữ liệu của bệnh nhân và của đặc điểm của phôi khảo sát được tóm tắt ở Bảng 1 và 2.

Bảng 1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

| Đặc điểm | Kết quả | P |
|--|-------------|-------|
| Tuổi vợ | 34,3±3,5 | >0,05 |
| Thời gian vô sinh trung bình (năm) | 5,3 ±0,3 | >0,05 |
| Nồng độ FSH cơ bản trung bình (mIU/ml) | 7,13±0,5 | >0,05 |
| Loại vô sinh | | |
| Vô sinh I | (54) 83,0 % | >0,05 |
| Vô sinh II | (11) 16,9% | >0,05 |
| Nguyên nhân vô sinh | | |
| Do chồng | 32 (49,2%) | >0,05 |
| Bất thường tử cung – vòi tử cung | 13 (20%) | >0,05 |
| Nguyên nhân phối hợp | 15 (23,0%) | >0,05 |
| Không rõ nguyên nhân | 5 (7,6%) | >0,05 |

Bảng 2. Đặc điểm của phôi trước và sau khi rã đông

| Đặc điểm | Kết quả | P |
|---|-----------------|-------|
| Số trứng trung bình chọc hút | 11,9±0,7 | >0,05 |
| Kích thước màng ZP trung bình (μm) | 16,6 ±0,7 | <0,05 |
| Tuổi vợ dưới 30 | 15,8 ±2,4 | <0,05 |
| Tuổi vợ 30 - 40 | 16,9±2,5 | <0,05 |
| Tuổi vợ trên 40 | 15,6±2,7 | <0,05 |
| Số phôi trữ trung bình | 4,9 ±0,4 | >0,05 |
| Số phôi sống sau rã đông | 143/153 (93,4%) | |
| Số phôi G1 sau rã đông | 80/143 (55,9) | |
| Số phôi G2 sau rã đông | 42/143 (29,3) | |

Bảng 3. Kết quả của chu kỳ chuyển phôi rã đông

| Đặc điểm | Kết quả | P |
|--|----------------|-------|
| Số chu kỳ rã – chuyển phôi | 65 | |
| Tổng số phôi chuyển | 143 | |
| Trung bình số phôi chuyển | 2,4±0,8 | <0,05 |
| Tỷ lệ phôi làm tổ / số phôi chuyển (%) | 28/143 (19,5%) | <0,05 |
| Tỷ lệ phôi làm tổ / chu kỳ (%) | 28/65 (43,1%) | >0,05 |
| Tỷ lệ có thai lâm sàng / chu kỳ (%) | 22/65 (33,8%) | <0,05 |
| Tỷ lệ sảy thai sớm | 8/65 (12,3%) | <0,05 |
| Tỷ lệ thai diễn tiến | 20/65 (30,8%) | >0,05 |
| Tỷ lệ đa thai | 4/22 (18,2%) | >0,05 |

4. BÀN LUẬN

Điều kiện cần thiết để phôi làm tổ vào niêm mạc buồng tử cung là hiện tượng thoát ra khỏi màng ZP. Trữ lạnh phôi là một kỹ thuật không thể thiếu trong hỗ trợ sinh sản. Tuy nhiên tiến trình trữ rã phôi có thể dẫn đến sự cứng lại của màng zona trong các chu kỳ chuyển phôi trữ (Carroll và cs., 1990; Tucker và cs., 1991). Một số nghiên cứu cho rằng mặc dù hầu hết các phân tử có thể vượt qua màng trong suốt, tốc độ vận chuyển có thể liên quan đến cấu trúc màng. Sự vận chuyển hai chiều của các chất chuyển hóa và các yếu tố tăng trưởng trên màng trong suốt có thể thay đổi do kích thước làm mỏng (Hanna Balakier và cs, 2012). Sự thay đổi đó có thể cho phép phôi tiếp xúc với các yếu tố tăng trưởng sớm hơn. Do vậy, AH đã mở ra tuyến đường quan trọng để truyền tải chất dinh dưỡng từ môi trường nuôi cấy đến phôi làm cho phôi tăng cường phát triển (Mandelbaum, 1996). Cấu trúc và độ dày màng ZP là yếu tố bị tác động bởi nhiều yếu tố. Tỷ lệ có thai ở nhóm phụ nữ có ZP trứng mỏng có thể cao hơn ở nhóm phụ nữ có ZP trứng dày (Cohen J, 1991, Garside WT, 1997).

Chính vì vậy, việc hỗ trợ thoát màng là cần thiết trong việc tăng khả năng làm tổ vào niêm mạc tử cung (Cohen, 1990, 1992), đặc biệt là phương pháp sử dụng tia laser (Ozhan atvar, 2010). Trong 65 chu kỳ chuyển phôi với tổng số 153 phôi được rã, tỷ lệ phôi sống chiếm 93,4% (143/153). Nghiên cứu chúng tôi ghi nhận kích thước màng ZP trung bình là $16,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$ và chưa thấy khác biệt theo tuổi mẹ. Một số nghiên cứu khác cũng không nhận thấy sự

liên quan giữa độ dày màng trong suốt của phôi với tuổi mẹ, nồng độ FSH cơ bản ngày thứ 3 của chu kỳ hay nồng độ E2 ngày tiêm hCG (Balaban, 2002. Hanna Balakier, 2012). Nghiên cứu của Ng. Ernest và cộng sự (2005) có độ dày màng trong suốt trung bình là $18 \mu\text{m}$, hay của Mauri và cộng sự (2001) là $17,8 \pm 3,1 \mu\text{m}$, của Pertersen và cộng sự (2006) là $17,2 \pm 2,7 \mu\text{m}$. Từ nghiên cứu này, chúng tôi có thể ghi nhận độ dày màng ZP mang tính cá thể hơn là yếu tố tuổi mẹ.

Đặc điểm đối tượng nghiên cứu của chúng tôi có độ tuổi mẹ trung bình khá cao so với một số nghiên cứu khác ($34,3 \pm 3,5$ tuổi) với thời gian vô sinh trung bình $5,3 \pm 0,3$ năm và nồng độ FSH cơ bản trung bình $7,13 \pm 0,5$. Nguyên nhân vô sinh chiếm tỷ lệ cao nhất là do yếu tố chồng (49,2%). Dù mong muốn ban đầu là phân tích sự ảnh hưởng của các đặc điểm này đến kết quả điều trị, tuy nhiên do cỡ mẫu nhỏ, việc phân tích thống kê không đánh giá được sự khác biệt có ý nghĩa. Trong tương lai, với cỡ mẫu lớn hơn, chúng tôi mong muốn tìm hiểu thêm về những khác biệt này, đặc biệt là ảnh hưởng đến đặc tính của màng ZP.

Kết quả chu kỳ điều trị của chúng tôi đáng khích lệ với tỷ lệ làm tổ 19,5% trên số phôi chuyển và 43,1% trên chu kỳ điều trị. Tỷ lệ thai lâm sàng 33,8% và thai diễn tiến 30,8% với tỷ lệ đa thai tương đối thấp (18,2%). So với các nghiên cứu khác, với cùng phương pháp làm mỏng ZP hay đục lỗ trên màng kích thước từ 20 μm -40 μm , kết quả này tương đương hoặc cao hơn.

Bảng 4. So sánh kết quả các nghiên cứu AH trên bệnh nhân chuyển phôi trữ

| Nhóm tác giả | Cách thức AH | Tỷ lệ làm tổ (%) | Tỷ lệ thai lâm sàng (%) |
|-----------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|
| Nghiên cứu chúng tôi | Làm mỏng 1/2ZP | 19,5 (28/143) | 33,8 (22/65) |
| Debrock và cs, 2008 | Làm mỏng 1/4ZP | 13 | 20 |
| Baratz và cs, 2002 | Làm mỏng 1/5ZP | 14,7 | 34,9 |
| Ng Ermest và cs, 2005 | Làm mỏng 1/4ZP | 9 | 12,5 |
| Balaban và cs, 2006 | Làm mỏng 1/4ZP | 20,1 | 40,9 |
| Petersen và cs, 2006 | Làm mỏng 1/4ZP | 7,9 | 18,8 |
| Fang Cong và cs, 2010 | Đục lỗ 20 μm | 14 | 32,7 |
| Friedman và cs, 2010 | Đục lỗ 30 μm | 17,8 | 22,5 |
| Hiraoka và cs, 2008 | Đục lỗ 40 μm | 27 | 43 |

Trong nghiên cứu này, chúng tôi không thiết kế nhóm chứng gồm những trường hợp chuyển phôi trữ không có hỗ trợ thoát màng. Mặc dù thiết kế nhóm chứng là cần thiết để đảm bảo tính khoa học nhưng theo y văn, kỹ thuật hỗ trợ thoát màng cho các trường hợp chuyển phôi trữ đã được xác định là ưu việt hơn so với nhóm không hỗ trợ nên việc

tiếp tục tiến hành nhóm chứng sẽ vi phạm đạo đức nghiên cứu. Nghiên cứu của Debrock và cs (2008) ở những trường hợp phôi trữ không hỗ trợ thoát màng, tỷ lệ làm tổ 15,9% và tỷ lệ có thai 21,1% với $p < 0,02$ hay nghiên cứu của Balaban và cs (2006) ghi nhận tỷ lệ làm tổ chỉ 9,9% và tỷ lệ có thai 27,3% với $p < 0,01$. Tương tự kỹ thuật đục lỗ cũng cho tỷ lệ có

thai và làm tổ cao hơn nhóm chứng không thực hiện hỗ trợ (Fang Cong và cs, 2010 tỷ lệ làm tổ 7,4%, tỷ lệ có thai 20,3% với $p < 0,05$). Mặc dù kết quả của chu kỳ điều trị chuyển phôi trữ thụ tinh ống nghiệm do nhiều yếu tố chi phối, thực hiện hỗ trợ thoát màng là một khâu cần thiết để đảm bảo ổn định hiệu quả.

Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng hệ thống Saturn 5 Active, làm mỏng màng ZP bằng tia laser với độ dài 30-40 μ m và rộng khoảng 50% chiều dày của màng. Sau đó phôi được ngâm trong môi trường Embryo Glue (Vitrolife, Sweden) từ 15-30 phút trước khi chuyển vào buồng tử cung. Ưu điểm của tia laser được tập trung thông qua các mục tiêu xác định và hệ thống tự vận hành theo phần mềm định sẵn một cách dễ dàng, chính xác, hạn chế thời gian phôi ở môi trường ngoài tử cung. Mặc dù một số nghiên cứu cho rằng hỗ trợ thoát màng bằng cách làm mỏng tốt hơn so với đục lỗ (Link, 2012; Kutlu, 2010), tổng quan y văn của Cochrane 2009 kết luận

phương pháp làm mỏng hay đục lỗ đem lại hiệu quả tương đương nhau.

5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 65 chu kỳ với 153 phôi được rã đông với tỷ lệ sống 93,4% (143 phôi), phôi loại G1 chiếm 55,9%, G2 chiếm 29,3% và tiến hành LAH trước khi chuyển phôi. Với số phôi chuyển trung bình 2,4 \pm 0,8, tỷ lệ làm tổ/số phôi chuyển 19,5% và trên số chu kỳ chuyển phôi là 43,1%. Tỷ lệ có thai lâm sàng tính trên chu kỳ chuyển phôi chiếm 33,8% với tỷ lệ sẩy thai sớm (thai sinh hóa và thai lâm sàng sẩy sớm) chiếm 12,3%. Tỷ lệ thai diễn tiến chiếm 30,8% và đặc biệt tỷ lệ đa thai thấp (chiếm 18,2%). Do các kết quả này tương đương hoặc tốt hơn khi so sánh với các nghiên cứu khác chuyển phôi có hoặc không hỗ trợ thoát màng, chúng tôi đi đến kết luận, LAH góp phần đảm bảo ổn định hiệu quả trong các chu kỳ chuyển phôi rã đông.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Balaban B and Urman B (2005) Comparison of two sequential media for cul-turing cleavage stage embryos and blastocysts: embryo characteristics and clinical outcome. *RBM Online* 10,485–491.

2. Eva Johnson et al (2002). Assisted hatching and cryopreservation: Impact on pregnancy rates in frozen embryo transfers. *Fertility and Sterility*. Volume 78, supplement 1, page S127, September 2002.

3. Friedman et al (2010). The effect of laser-assisted hatching on implantation and pregnancy rates of frozen-thawed blastocysts. *Fertility and Sterility*. Volume 94, Issue 4, page S254, September 2010.

4. Gabrielsen A, Agerholm I, Toft B, Hald F, Petersen K, Aagaard J, Feldinger B, Lindenberg S and Fedder J (2004) Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. *Hum Reprod* 19,2258–2262.

5. Hirotooshi Miyata et al. (2010). Relevance of the site of assisted hatching in thawed human blastocysts: a preliminary report. *Fertility and Sterility*. Volume 94, Issue 6, supplement 1, page S127, November 2010, p.2444-2447.

6. Hanna Balakier et al (2012). Is the zona pellucida thickness of human embryos influenced by woman's age and hormonal levels? *Fertility and Sterility* Volume 98, Issue 1, Pages 77-83, July 2012.

7. Karlstrom PO, Bergh T, Forsberg AS, Sandkvist V, Wikland M (1997) Prognostic factors for the success rate of embryo freezing. *Hum Reprod* 12,1263–1266.

8. Kutlu et al (2010). Laser assisted zona thinning technique has no beneficial effect on the ART outcomes of two different maternal age groups. *J Assist Reprod Genet*. 2010 August; 27 (8): 457-461.

9. Link et al (2012). Laser-assisted hatching (LAH) of cryopreserved embryos-the significance of hole size. *Fertility and Sterility*. Volume 98, Issue 3, supplement 1, page 79-S80, September 2012.

10. Ng E, Naveed F, Lau R, Yeung WS, Chan CC, Tang OC and Ho PC (2005). 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* 20,979–985.

11. Ren, X., Q. Liu, et al. (2013). "Effect of the site of assisted hatching on vitrified-warmed blastocyst transfer cycles: a prospective randomized study." *J Assist Reprod Genet* 30(5): 691-697.

12. Wellington P. et al (2011). Assisted hatching of human embryos: A Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* (2011) 17 (4): 438-453.