

ارتباط بین کمبود پروتامین با پارامترهای اسپرمی، مورفولوژی پیش‌هسته‌های زیگوت، ضریب تسهیم و کیفیت جنین

شهناز رضوی Ph.D.^۱، محمد حسین نصر اصفهانی Ph.D.^{۲،۳}، محمد مردانی Ph.D.^۱، ستاره جوانمردی M.Sc.^۱

۱. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

۲. پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

۳. پژوهشکده رویان، مرکز باروری و ناباروری اصفهان

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

پست الکترونیک: [Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir](mailto:mh_nasr@med.mui.ac.ir)

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۳/۷، پذیرش مقاله: ۸۵/۶/۱

هدف: ارزیابی ارتباط بین کمبود پروتامین با پارامترهای اسپرمی، مورفولوژی پیش‌هسته‌های زیگوت، ضریب تسهیم و کیفیت

جنین

مواد و روش‌ها: مایع منی ۱۶۰ بیمار کاندید ICSI و IVF جمع‌آوری شد و آنالیز پارامترهای اسپرمی (غلظت و تحرک اسپرم) بر روی آن انجام گرفت. بخش دیگر نمونه با استفاده از روش گرایدان Pure Sperm آماده شد. از باقیمانده نمونه آماده شده برای رنگ‌آمیزی پاپانیکولایو جهت ارزیابی مورفولوژی اسپرم طبق معیار WHO و نیز رنگ‌آمیزی CMA3 اسمیر تهیه شد. ۱۸ تا ۲۰ ساعت پس از مجاورت اسپرم با تخمک در روش IVF و تزریق اسپرم در روش ICSI، با توجه به نحوه قرارگیری پیش‌هسته‌ها، اجسام پیش‌هستی و نیز محور پیش‌هسته‌ها نسبت به اجسام قطبی با استفاده از نرم‌افزار Zilos و تهیه تصاویر ویدیویی، زیگوت‌ها در ۸ گروه طبقه‌بندی و در روز سوم پس از لقاح سرعت تسهیم و کیفیت جنین‌ها ارزیابی شد.

یافته‌ها: بین درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین و پارامترهای اسپرمی رابطه معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.01$). همچنین مشاهده شد با افزایش درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین میزان لقاح کاهش می‌یابد ($p < 0.01$). به علاوه بین زیگوت‌های دارای پیش‌هسته‌های نابرابر و درصد ناهنجاری مورفولوژی اسپرم ارتباط معنی‌داری وجود دارد، در حالی که بین درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین با مورفولوژی پیش‌هسته‌ها، ضریب تسهیم و کیفیت جنین ارتباط معنی‌داری به دست نیامد ($p > 0.05$). با این وجود، بین قطبیت اجسام پیش‌هستی با ضریب تسهیم جنین در روز سوم رابطه مستقیم و معنی‌داری دیده شد ($r = 0.237$, $p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: نتایج فوق بیانگر رابطه بین میزان کمبود پروتامین با درصد لقاح است اگر چه میزان کمبود پروتامین اسپرم تأثیری بر روند تکون جنین بعد از لقاح ندارد. استفاده از مورفولوژی زیگوت جهت انتخاب و انتقال جنین با کیفیت بالا قابل توجه و ارزشمند است اما به تنهایی کافی نیست و ارزیابی وضعیت تسهیم می‌تواند یک پارامتر مکمل باشد.

کلیدواژگان: مورفولوژی پیش‌هسته، پروتامین، تسهیم، میزان باروری، انتقال جنین

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۲، تابستان ۸۵، صفحات ۸۷-۸۰

مقدمه

اساس ظاهر مورفولوژیکی از مرحله زیگوت تا مرحله بلاستوسیست ارزیابی می‌شوند (۳). معیارهای مورفولوژیکی متعددی جهت کمک به این انتخاب مهم پیشنهاد شده است که از جمله، اندازه و موقعیت قرارگیری پیش‌هسته‌ها (Pronucleous: PN)، تعداد و نحوه توزیع اجسام پیش‌هستی درون پیش‌هسته‌ها (Nucleolar Precursor Body: NPB) (۴، ۵)، نحوه قرارگیری محور پیش‌هسته‌ها نسبت به اجسام قطبی (۶)، زمان اولین تقسیم تسهیم (۷) و میزان فراگمتاسیون (۸، ۹) را می‌توان نام برد.

در سیستم امتیازبندی بر اساس مورفولوژی مرحله پیش‌هسته‌ای، چهار پارامتر اصلی (اندازه و موقعیت قرارگیری پیش‌هسته‌ها، هاله

امروزه جهت دستیابی به حاملگی در زوج‌های نابارور از روش‌های درمانی (Assisted Reproduction Techniques: ART) استفاده می‌شود. با این وجود جهت افزایش احتمال حاملگی به دنبال استفاده از این تکنیک‌ها، بیش از یک جنین به رحم مادر انتقال داده می‌شود که این روند با افزایش خطر ایجاد حاملگی چندقلویی، زندگی مادر و جنین را تهدید می‌کند (۱). بنابراین یکی از تصمیم‌گیری‌های مهم در مراکز ART تشخیص و انتخاب جنینی است که بالاترین کیفیت را دارد و جهت انتقال به درون رحم مناسب باشد.

در خلال این سال‌ها، سیستم‌های امتیازبندی متعددی جهت انتخاب جنین با کیفیت بالا ارائه شده است (۲). در این تکنیک‌ها جنین‌ها بر

سیتوپلاسمی و الگوی توزیع اجسام پیش‌هستکی) در نظر گرفته می‌شود (۱۰).

برای اولین بار، اسکات و اسمیت استفاده از سیستم امتیازبندی جهت انتخاب جنین را ارائه کردند. نتایج آنان نشان داد لانه‌گزینی جنین‌هایی که دارای هاله سیتوپلاسمی و اجسام پیش‌هستکی قطبی بودند و ۲۶-۲۴ ساعت بعد از ورود اسپرم به مرحله دو سلولی رسیده بودند، نسبت به جنین‌هایی که چنین وضعیتی نداشتند بسیار بالاتر بود (۴). این گروه نتایج دیگری نیز در تایید یافته‌های اولیه خود به دست آوردند (۱۰).

در سیستم امتیازبندی دیگری تزاریک و گریکو، زیگوت‌ها را بر اساس تعداد و نحوه توزیع اجسام پیش‌هستکی به یک گروه نرمال (الگوی صفر) و ۵ گروه غیرنرمال (۱-۵) تقسیم‌بندی کردند. یافته‌های آنان نشان داد هم اندازه بودن پیش‌هسته‌ها بسیار بیشتر از قطبیت طبیعی اجسام پیش‌هستکی درون هر پیش‌هسته در رشد و تکامل جنین موثر است (۵).

مطالعات دیگری نیز که رابطه بین مورفولوژی جنین در مرحله پیش‌هسته‌ای را با مورفولوژی جنین در روز انتقال جنین (روز سوم) و میزان لانه‌گزینی جنین انتقالی بررسی کرده‌اند نشان دادند در مواردی که اجسام پیش‌هستکی در مرحله پیش‌هسته‌ای توزیع قطبی دارند مورفولوژی جنین روز سوم بهتر و میزان لانه‌گزینی به طور معنی‌داری بالاتر است (۱۱، ۱۲، ۱۳). با این وجود، دیل و همکاران نتیجه‌ای متفاوت را گزارش کردند به طوری که یافته‌های آنان نشان داد در میزان لانه‌گزینی و حاملگی زیگوت‌هایی که براساس مورفولوژی مرحله پیش‌هسته‌ای انتخاب شده بود در مقایسه با مواردی که انتخاب زیگوت‌ها تصادفی صورت گرفته بود تفاوت معنی‌داری دیده نشد (۱۴). اسکات در مطالعات بعدی خود زیگوت‌ها را بر اساس اندازه دو پیش‌هسته، وضعیت قرارگیری و اندازه اجسام پیش‌هستکی به ۵ گروه طبقه‌بندی کرده و اعلام کرد بین میزان لانه‌گزینی و درصد حاملگی با کیفیت هستک‌های درون هر پیش‌هسته رابطه‌ای قوی وجود دارد. همچنین در مواردی که بین اندازه دو پیش‌هسته تفاوت زیادی وجود دارد معمولاً یک نقص کروموزومی (آنوپلویدی) دیده می‌شود (۱۵).

در تمامی سیستم‌های امتیازبندی پیشنهاد شده، مورفولوژی مرحله پیش‌هسته‌ای به عنوان معیار مهمی جهت ارزیابی کیفیت جنین مورد توجه قرار گرفته است. از طرفی عدم همزمانی در شکل‌گیری دو پیش‌هسته باعث ایجاد اندازه‌های نابرابر دو پیش‌هسته و نیز موقعیت نابجای آن، در درون زیگوت می‌شود که این به نوبه خود بر روی میزان رشد و کیفیت بعدی جنین تاثیر می‌گذارد.

از آنجا که ورود اسپرم آغازگر فعال شدن تخمک و شکل‌گیری دو پیش‌هسته نر و ماده است باید کیفیت اسپرم از طریق بررسی‌های مورفولوژیک مورد توجه قرار گیرد.

بررسی‌های متعددی نشان می‌دهد کمبود پروتامین باعث کاهش میزان لقاح در موارد ICSI و IVF می‌گردد (۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹). به علاوه نصرانصفهانی و همکاران اعلام کردند که بین مورفولوژی اسپرم و درصد

اسپرم‌های CMA3 مثبت بعد از آماده‌سازی مایع منی با درصد لقاح رابطه معنی‌داری وجود دارد (۲۰). از طرفی مطالعات متعددی نیز رابطه بین مورفولوژی نرمال اسپرم، ضریب تسهیم و کیفیت جنین و حاملگی را تایید کرده‌اند (۲۱، ۲۲، ۲۳).

یکی از موارد مهمی که می‌تواند بر روی مورفولوژی و ظرفیت عملکردی اسپرم موثر باشد، کمبود پروتامین در هسته اسپرم است. این کمبود باعث می‌شود که اسپرم وارد شده به درون تخمک تحت تاثیر (Mitotic Promoting Factor: MPF) فعال موجود در درون تخمک دچار تراکم زودرس کروماتین (Premature Chromatin Condensation: PCC) گردد و در صورت خروج از PCC، شکل‌گیری پیش‌هسته ناقص و یا با تاخیر صورت می‌گیرد (۲۴). بنابراین پیشنهاد شده است که کمبود پروتامین می‌تواند بر مورفولوژی پیش‌هسته‌ها موثر باشد. از طرفی بیشتر مطالعات انجام شده موید این نکته است که بین مورفولوژی پیش‌هسته‌ها با کیفیت جنین و میزان لانه‌گزینی رابطه وجود دارد (۴، ۵، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۵). هدف از این مطالعه بررسی رابطه بین کمبود پروتامین با پارامترهای اسپرمی، مورفولوژی پیش‌هسته‌ها، ضریب تسهیم و کیفیت جنین است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی ۱۶۰ زوج کاندید روش درمانی ICSI و IVF انجام گرفت. سن زوجین بین ۲۰-۴۰ سال بود. پس از پذیرش و کسب رضایت از بیماران و تهیه نمونه و آماده‌سازی آن جهت انجام ICSI و IVF، از باقیمانده نمونه برای انجام رنگ‌آمیزی پاپانیکولاو و CMA3 جهت ارزیابی استفاده شد و تکنیک ICSI و IVF بر اساس روش‌های روتین انجام گرفت. ارزیابی وجود لقاح و مورفولوژی پیش‌هسته‌ها و امتیازبندی جنین‌ها به صورت روزانه انجام شد و ضریب تسهیم و کیفیت جنین بررسی و محاسبه شد. لازم به ذکر است تمامی مواد مصرفی در این مطالعه به جز موارد اشاره شده در متن از شرکت سیگما تهیه شده است.

مراحل آماده‌سازی اسپرم

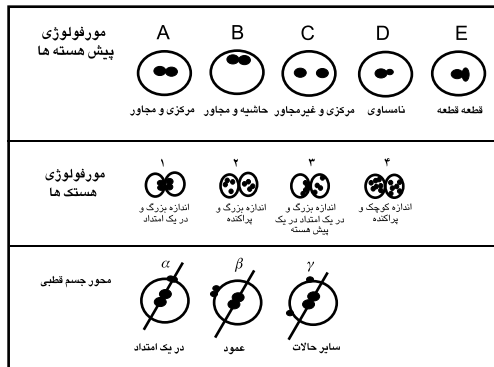
نمونه‌های مایع منی بیماران در روز آزمایش جمع‌آوری شد. بخشی از نمونه جهت آنالیز پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم) استفاده و بخش دیگر نمونه به دنبال یک بار شستشو با محیط Ham's F₁₀ (۳۰۰-۶ دقیقه) برای انجام تکنیک ICSI و IVF آماده شد.

ارزیابی مورفولوژی اسپرم

نمونه‌های اسپرمی شستشو شده، با استفاده از تکنیک پاپانیکولاو رنگ‌آمیزی شد. آنالیز مورفولوژی اسپرم بر اساس معیارهای WHO انجام گرفت (۲۵) که شامل ارزیابی سر، گردن و دم اسپرم است. معیار نرمال بودن اسپرم، سر بیضی شکل با محیط صاف، ۵-۶ میکرومتر طول،

تاثیر کمبود پروتامین بر مورفولوژی پیش هسته ها

تشکیل پیش هسته‌ها ارزیابی و درصد لقاح در هر گروه ثبت شد. سپس تخمک‌های لقاح یافته حاوی دو پیش هسته جدا و در محیط کشت قرار داده شد. طی این عمل، توسط نرم افزار Zilos از تخمک‌های لقاح یافته تصاویر ویدیویی تهیه و قطر پیش هسته‌ها توسط نرم‌افزار اندازه‌گیری شد. سپس زیگوت‌های به دست آمده با استفاده از سیستم امتیازبندی لوکاجینارولی، بر اساس نحوه قرارگیری پیش هسته‌ها و اجسام پیش‌هستکی و نیز جایگاه اجسام قطبی طبقه بندی شد (شکل ۱) (۲۶). روز سوم پس از لقاح جنین‌های به دست آمده از نظر سرعت تسهیم و کیفیت، به وسیله میکروسکوپ نوری بررسی شدند.



شکل ۱: بر اساس وضعیت قرارگیری پیش‌هسته‌ها زیگوت‌ها در ۵ گروه (A, B, C, D, E) طبقه‌بندی شدند. نیز با توجه به الگوی توزیع اجسام پیش‌هستکی درون پیش‌هسته‌ها، زیگوت‌ها در گروه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ قرار داده شدند. براساس جایگاه قرارگیری اجسام قطبی سه الگوی (α, β و γ) در نظر گرفته شد.

تعیین ضریب تسهیم و کیفیت جنین

جهت تعیین ضریب تسهیم در هر نمونه، به جنین‌های دو سلولی امتیاز ۱، به جنین‌های ۳-۴ سلولی امتیاز ۲، به جنین‌های ۵-۶ سلولی امتیاز ۳ و به جنین‌های ۷-۸ سلولی امتیاز ۴ داده شد. ضریب تسهیم برای هر بیمار با تقسیم مجموع امتیاز تسهیم جنین‌ها بر تعداد کل جنین‌ها به طور جداگانه محاسبه گردید. برای محاسبه ضریب کیفیت، جنین‌ها به ۳ گروه A, B, C، تقسیم‌بندی شدند:

گروه A: جنین‌هایی با اندازه یکسان بلاستومرها و فراگمتاسیون کمتر از ۱۰ درصد که به این جنین‌ها امتیاز ۳ داده شد.

گروه B: جنین‌هایی با اندازه یکسان بلاستومرها و با فراگمتاسیون ۵۰-۱۰ درصد که به این جنین‌ها امتیاز ۲ داده شد.

گروه C: جنین‌هایی با اندازه نامساوی بلاستومرها و فراگمتاسیون بیش از ۵۰ درصد که به این جنین‌ها امتیاز ۱ داده شد.

ضریب کیفیت جنین برای هر بیمار با تقسیم مجموع امتیازهای کیفیت جنین‌ها بر تعداد کل جنین‌ها محاسبه شد.

آنالیز آماری

آنالیز نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار (Spss 11.5) انجام گرفت. از ضریب همبستگی پیرسون (Correlation Coefficient) برای ارزیابی رابطه بین پارامترهای

۲/۵-۳/۵ میکرومتر قطر، اشغال ۷۰-۴۰ درصد سر اسپرم توسط آکروزوم و فقدان آنومالی در ناحیه گردن و دم بوده است. اسپرم‌هایی که قطرات سیتوپلاسمی آنها بیش از نصف اندازه سر اسپرم بوده است غیرطبیعی محسوب شده‌اند. به این ترتیب در هر اسلاید تعداد ۱۰۰ اسپرم بررسی و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی محاسبه شد.

ارزیابی کمبود پروتامین (رنگ آمیزی کرومومایسین CMA3 = A3)

اسمیرهای آماده شده از نمونه شستشو شده در محلول کارنوی (متانول و اسید استیک با نسبت ۱:۳) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس شدند. به منظور انجام رنگ‌آمیزی CMA3، هر اسلاید به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CMA3 رنگ‌آمیزی شد (غلظت ۰/۲۵ درصد میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر مک‌الوین: جهت تهیه بافر مک‌الوین ۷ میلی‌لیتر اسید استیک ۰/۱ و ۳۲/۹ میلی‌لیتر از Na_2HPO_4 و H_2O و با غلظت ۲/۰ مولار $\text{pH}=7$ شامل ۱۰ میلی‌مولار از MgCl_2 استفاده می‌شود). پس از چسباندن لامل بر روی لام با استفاده از یک قطره بافر گلیسرول، به وسیله میکروسکوپ فلوروسانت (BX51, Tokyo, Japan)، با فیلتر ۴۶۰-۴۷۰ در همان روز ۱۰۰ اسپرم شمارش شد. درصد اسپرم‌های با رنگ زرد درخشان (CMA3^+) و اسپرم‌های با رنگ زرد تیره (CMA3^-) با استفاده از نرم افزار Olysia محاسبه شد.

روش انجام ICSI و IVF

پس از تحریک و القای تخمک‌گذاری توسط داروهای حاوی FSH و HCG، فولیکول‌ها توسط سونوگرافی واژینال تخلیه شده و در محیط G-MOP (vitrolife, Gothenburg, Sweden) شستشو داده شد. جهت انجام ICSI به تخمک‌ها آنزیم هیالورونیداز اضافه شد تا سلول‌های اطراف تخمک جدا شدند. پس از چندین بار شستشو تخمک‌ها به ظرف میکرواینجکشن که حاوی قطرات G-MOP است منتقل شدند. اسپرم‌های شستشو داده شده توسط گرادینانت‌های Pure Sperm نیز به داخل قطره PVP در همین ظرف انتقال داده شد. سپس با استفاده از دستگاه میکرومانیپولار، اسپرم با حرکت و مورفولوژی مناسب انتخاب و توسط پیست مخصوص به داخل تخمک تزریق گردید. در تکنیک IVF، تخمک‌های جمع‌آوری شده در ظروف مخصوص حاوی محیط کشت Ham's F₁₀ HSA ۱۰٪ شستشو و در محیط Ham's F₁₀ کشت در زیر پارافین مایع به دو گروه تقسیم و به محیط IVF₂₀ (vitro life, Gothenburg, Sweden) منتقل شدند و بعد از ۲ ساعت تعداد ۱۰۰/۰۰۰-۵۰/۰۰۰ اسپرم متحرک به ازای هر تخمک تلقیح شد.

ارزیابی مورفولوژی پیش هسته‌ها

۲۰-۱۸ ساعت پس از انجام ICSI و IVF، وجود لقاح با توجه به

مورد نظر استفاده شد و در صورتی که $p < 0.05$ بود از لحاظ آماری رابطه معنی دار محسوب شد.

که چنین رابطه‌ای به جز لقاح با سایر پارامترها در نمونه‌های IVF دیده نمی‌شود.

یافته‌ها

جزئیات تعداد تخمک‌های به دست آمده، قابل تزریق و نیز انواع زیگوت‌های به دست آمده بعد از انجام ICSI و IVF در جدول ۱ خلاصه شده است. با توجه به این جدول بیشترین تعداد (۱۵۵ مورد) مربوط به الگوی A2 α و کمترین تعداد (۲۵ مورد) متعلق به گروه A4 β بود.

با توجه به کم بودن تعداد نمونه‌های دارای الگوی D, C, B و E در گروه اول، در این مطالعه تنها پیش‌هسته‌هایی که دارای الگوی A بودند مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین در بررسی الگوهای مربوط به نحوه قرارگیری جسم قطبی، چون نمونه‌های بسیار کمی الگوی Y را داشتند این الگو از مطالعه حذف شد. به طور کلی با ترکیب الگوهای هر سه گروه با هم از نظر مورفولوژی ۸ گروه جدید به دست آمد (شکل ۲). (A1 α -A2 α -A3 α -A4 α -A1 β -A2 β -A3 β -A4 β)

جدول ۲، رابطه بین درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین (CMA3⁺) را با پارامترهای اسپرمی و میزان لقاح نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود از لحاظ آماری بین درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین (CMA3⁺) و پارامترهای اسپرمی (غلظت اسپرم، تحرک، ناهنجاری مورفولوژی و ناهنجاری مورفولوژی سر اسپرم) و نیز درصد لقاح در نمونه‌های ICSI رابطه معنی داری وجود دارد. در حالی

جدول ۱: جزئیات تعداد کل تخمک‌های به دست آمده و آنالیز مورفولوژی پیش‌هسته‌های زیگوت‌های حاصل از کل بیماران

متغیر	تعداد	درصد
کل تخمک‌های به دست آمده	۱۵۵۳	-
تخمک‌های سالم و بالغ در کل بیماران	۱۴۱۳	-
تخمک‌های سالم و بالغ در موارد ICSI	۱۰۲۲	۷۲/۳۲ درصد
تخمک‌های سالم و بالغ در موارد IVF	۳۹۱	۲۷/۶۷ درصد
تخمک‌های لقاح نیافته (open)	۵۲۴	۳۷/۳ درصد
زیگوت‌های دارای یک پیش‌هسته (1pn)	۷۵	۵/۲ درصد
زیگوت‌های دارای پیش‌هسته (3pn)	۸۹	۶/۲ درصد
زیگوت‌های دارای دو پیش‌هسته (2pn) در کل بیماران	۷۱۵	۴۹/۹ درصد
زیگوت‌های دارای دو پیش‌هسته (2pn) در موارد ICSI	۵۱۳	۷۰/۳ درصد
زیگوت‌های دارای دو پیش‌هسته (2pn) در موارد IVF	۲۱۲	۲۹/۶ درصد
زیگوت‌های دارای الگوی A2 α	۱۵۵	۲۱/۶۷ درصد
زیگوت‌های دارای الگوی A2 β	۱۴۴	۲۰/۱۳ درصد
زیگوت‌های دارای الگوی A3 α	۱۱۶	۱۶/۲۲ درصد
زیگوت‌های دارای الگوی A3 β	۸۸	۱۲/۳۰ درصد
زیگوت‌های دارای الگوی A1 α	۸۶	۱۲/۰۲ درصد
زیگوت‌های دارای الگوی A1 β	۶۴	۸/۹۵ درصد
زیگوت‌های دارای الگوی A4 α	۳۴	۴/۷۵ درصد
زیگوت‌های دارای الگوی A4 β	۲۵	۳/۴۹ درصد

جدول ۲: رابطه بین درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین (CMA3⁺) با پارامترهای اسپرمی، درصد لقاح، ضریب تسهیم و کیفیت جنین در سه گروه (IVF ICSI و کل بیماران)

متغیر	درصد اسپرم‌های ICSI (CMA3 ⁺) در بیماران (۱۵۶ نمونه)		درصد اسپرم‌های IVF (CMA3 ⁺) در بیماران (۵۷ نمونه)		درصد اسپرم‌های (CMA3 ⁺) در کل بیماران (۲۱۳ نمونه)	
	P-value	ضریب همبستگی (r)	P-value	ضریب همبستگی (r)	P-value	ضریب همبستگی (r)
غلظت اسپرم (x10 ⁶ میلی‌لیتر)	۰/۰۰۹*	۰/۱۱	۰/۲۲۷	۰/۲۱۶	۰/۰۰۴*	۰/۲۳۶
درصد تحرک اسپرم	۰/۰۰۱*	۰/۱۹	۰/۸۹۲	۰/۲۵۲	۰/۰۰۱*	۰/۳۲۱
درصد ناهنجاری مورفولوژیک اسپرم	۰/۰۰۱*	۰/۲۴۸	۰/۰۷۰	۰/۴۸۸	۰/۰۰۱*	۰/۵۶۳
درصد ناهنجاری مورفولوژیک سر اسپرم	۰/۰۰۱*	۰/۲۵	۰/۰۶۸	۰/۵۱۰	۰/۰۰۱*	۰/۵۸۴
درصد لقاح	۰/۰۰۱*	۰/۳۷۵	۰/۰۰۸*	۰/۴۷۹	۰/۰۰۱*	۰/۵۲۶
ضریب تسهیم در روز سوم	۰/۰۶۲	۰/۲۹۲	۰/۱۶۴	۰/۰۹۶	۰/۲۰۶	۰/۰۴۴
ضریب کیفیت جنین در روز سوم	۰/۰۴۵	۰/۰۴۳	۰/۷۵۹	۰/۰۳۰	۰/۶۹۴	۰/۰۴۳

* از لحاظ آماری در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار است.

جدول ۳: رابطه بین مورفولوژی پیش‌هسته‌های زیگوت با درصد ناهنجاری مورفولوژی و کمبود پروتامین (CMA3⁺) اسپرم، ضریب تسهیم و کیفیت جنین در کل بیماران

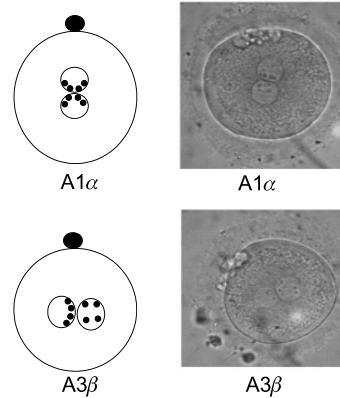
متغیر	درصد پیش‌هسته‌های نامساوی		درصد قطبیت اجسام پیش‌هستگی	
	P-value	ضریب همبستگی (r)	P-value	ضریب همبستگی (r)
درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم	۰/۱۷۲	۰/۱۲*	۰/۱۰۷	۰/۸۰۶
درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین (CMA3 ⁺)	۰/۱۰۵	۰/۱۶۹	۰/۱۱	۰/۸۸۹
ضریب تسهیم در روز سوم	۰/۰۷۷	۰/۲۶۳	۰/۲۳۷	۰/۰۰۱*
ضریب کیفیت جنین در روز سوم	۰/۰۵۱	۰/۴۵۸	۰/۰۷۶	۰/۲۷۱

* از لحاظ آماری در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار است.

پروتامین) در نمونه‌های ICSI رابطه معنی داری وجود دارد. همچنین بین درصد لقاح و درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت در هر دو گروه ICSI و IVF رابطه معنی داری به دست آمد. این نتایج می‌تواند بیانگر این نکته باشد که بر خلاف روش IVF که مورفولوژی طبیعی اسپرم نقش مهمتری را ایفا می‌کند، در روش ICSI کمبود پروتامین اهمیت بیشتری دارد و شاید این امر ناشی از کم شدن تأثیر پارامترهای اسپرمی به دلیل تزریق مستقیم اسپرم به درون تخمک باشد (۲۹). نتایج به دست آمده حاکی است بین درصد پیش‌هسته‌های نابرابر و درصد ناهنجاری‌های مورفولوژی اسپرم رابطه مستقیمی وجود دارد. یعنی مورفولوژی اسپرم می‌تواند بر روی اندازه پیش‌هسته‌ها مؤثر باشد. در حالی که بین درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت و اندازه پیش‌هسته‌ها رابطه معنی داری دیده نمی‌شود. بر اساس فرضیه پیشنهادی تحقیق حاضر وجود هیستون اضافی و یا کمبود پروتامین (CMA3 مثبت) در هسته اسپرم باعث می‌شود که اسپرم وارد شده به درون تخمک تحت تأثیر MPF فعال وارد فاز PCC شود و در صورت خروج از این مرحله، تشکیل پیش‌هسته ناقص و یا با تأخیر انجام گیرد که به نوبه خود می‌تواند باعث نابرابری دو پیش‌هسته نر و ماده شود. اما بر اساس نتایج به دست آمده این فرضیه اثبات نشد. با توجه به اینکه بین درصد لقاح و درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت رابطه معکوس و معنی داری دیده می‌شود می‌توان فرض کرد در مواردی که اسپرم وارد شده به تخمک دارای کمبود پروتامین باشد (CMA3 مثبت) باعث شکست در روند لقاح شده و هیچ پیش‌هسته‌ای شکل نمی‌گیرد که بتوان اندازه آنها را با هم مقایسه کرد. بدین ترتیب می‌توان دریافت کمبود پروتامین اسپرم فقط در روند لقاح مؤثر است و مراحل بعدی تکامل جنین را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد. تنها پارامتری که با زیگوت‌های دارای پیش‌هسته‌های نابرابر رابطه داشت مورفولوژی اسپرم بود. این رابطه نشان دهنده این است که احتمالاً ناهنجاری سر اسپرم می‌تواند منجر به تأخیر در روند تشکیل پیش‌هسته‌ها و در نهایت ایجاد پیش‌هسته‌های نابرابر گردد.

با انجام مطالعات متعددی که بر اساس مورفولوژی مرحله پیش‌هسته‌ای صورت گرفت محققان توانستند رابطه معنی داری را بین مورفولوژی زیگوت و کیفیت جنین در روز سوم به دست آورند (۱۱، ۱۲، ۱۳). سایر مطالعات نیز اثبات کرد که اندازه پیش‌هسته‌ها به عنوان عامل مهمی، میزان رشد جنین از روز سوم به بعد را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۰). با این وجود تزاریک در ادامه تحقیقات خود عنوان کرد که باید توجه شود جنین‌هایی که در مرحله تشکیل پیش‌هسته‌ها کیفیت بالایی ندارند الزاماً در سایر مراحل، رشد ضعیف نخواهند داشت و نیز میزان فراگمتاسیون در این جنین‌ها افزایش نمی‌یابد (۳۱).

تحقیقاتی که در این زمینه توسط ادسون برگز و سالومتر انجام گرفت نیز نشان داد که بین مورفولوژی پیش‌هسته‌ها و کیفیت جنین در روز سوم ارتباط معنی داری وجود ندارد. جنینی که در مرحله زیگوت جز جنین‌های با کیفیت خوب قرار می‌گرفت، در روز سوم الزاماً از کیفیت خوبی برخوردار نبود (۳۲، ۳۳).



شکل ۲: فتومیکروگراف و تصویر شماتیک از زیگوت‌های حاوی دو پیش‌هسته

در جدول ۳ رابطه بین مورفولوژی پیش‌هسته‌های زیگوت با درصد ناهنجاری‌های مورفولوژی، کمبود پروتامین، ضریب تسهیم و کیفیت جنین مشخص شده است. بین درصد زیگوت با پیش‌هسته‌های نابرابر و درصد ناهنجاری مورفولوژی اسپرم رابطه مستقیم و معنی داری وجود دارد اما جنین رابطه‌ای بین توزیع قطبی اجسام پیش‌هستکی و درصد ناهنجاری‌های مورفولوژی اسپرم دیده نمی‌شود (جدول ۳). همچنین نتایج این جدول نشان می‌دهد که بین درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت با شاخص‌های مربوط به مورفولوژی پیش‌هسته‌ها رابطه معنی داری وجود ندارد. از طرفی با بررسی رابطه بین مورفولوژی پیش‌هسته‌ها با ضریب تسهیم و کیفیت جنین در روز سوم (روز انتقال جنین)، مشخص می‌شود بین وضعیت قطبی اجسام پیش‌هستکی و ضریب تسهیم جنین در روز سوم رابطه معنی داری دیده می‌شود ($r=0.237$, $p<0.001$).

بحث

به منظور کاهش حاملگی چندقلویی سعی می‌شود تعداد جنین کمتر با کیفیت مناسب به درون رحم مادر انتقال داده شود (۲۷). بنابراین یکی از تصمیم‌گیری‌های مهم در مراکز ART تشخیص و انتخاب جنینی است که بالاترین کیفیت را دارد و جهت انتقال به درون رحم مناسب باشد. به همین منظور طی سال‌ها تحقیق، سیستم‌های امتیازبندی متعددی جهت انتخاب جنین با کیفیت بالا ارائه شده است.

انتخاب جنین در مرحله زیگوت (zygote) در کشورهایی مثل آلمان، انگلستان و نیوزیلند بسیار مفید است زیرا در این کشورها قانون حمایت از جنین، انجماد جنین در مرحله تسهیم را منع می‌کند (۲۸). از طرفی در بعضی از تکنیک‌های ART مثل (Zygote Intra Fallopian Transfer: ZIFT) انتقال جنین فقط در مرحله پیش‌هسته‌ای انجام می‌گیرد که بنابراین تشخیص جنین با کیفیت در این مرحله ضروری است.

در تحقیق حاضر در ابتدا رابطه بین کمبود پروتامین با پارامترهای اسپرمی بررسی شد. مطالعات قبلی (۲۱، ۲۲، ۲۳) و نیز یافته‌های ما در این تحقیق نشان می‌دهد بین غلظت، تحرک و درصد ناهنجاری‌های مورفولوژی اسپرم با درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت (دارای کمبود

مطالعات متعددی که در این زمینه صورت گرفته است نشان می‌دهد جنین‌های دارای اجسام پیش‌هستیکی نابرابر، رشد کمتر، میزان فراگمتاسیون بیشتر و تسهیم ناهنجاری را نشان می‌دهند و سرانجام تعداد معدودی از جنین‌ها رشد خود را تا مرحله بلاستوسیست ادامه می‌دهند و به دنبال انتقال این جنین‌ها میزان لانه‌گزینی بسیار کم بوده است (۳۶، ۳۷، ۳۸).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بین مورفولوژی اسپرم و نحوه توزیع اجسام پیش‌هستیکی در هیچ یک از گروه‌ها (IVF، ICSI) رابطه معنی‌داری وجود ندارد. اما در مواردی که در زیگوت‌ها الگوی اجسام پیش‌هستیکی قطبی است ضریب تسهیم جنین در روز سوم بالاتر است. یافته‌های مطالعات قبلی نتایج این مطالعه را تایید می‌کند (۱۱، ۳۰، ۳۹). اما با بررسی جنین‌ها در هر گروه (اجسام پیش‌هستیکی دارای الگوی قطبی و غیرقطبی) کیفیت آن‌ها با مورفولوژی اجسام پیش‌هستیکی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد یعنی مورفولوژی مرحله پیش‌هسته‌ای اثری بر روی کیفیت جنین در روز سوم نداشته است. این نتیجه در مطالعات ادسون برگزو سالومتر نیز دیده می‌شود. بررسی‌های آنان نشان داد بین مورفولوژی مرحله پیش‌هسته‌ای و کیفیت جنین و میزان لانه‌گزینی رابطه معنی‌داری وجود ندارد. اما با این وجود سرعت تسهیم جنین‌هایی که در مرحله پیش‌هسته‌ای دارای اجسام پیش‌هستیکی قطبی هستند بالاتر است (۳۲، ۳۳). همچنین در بررسی رابطه بین درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت با ضریب تسهیم و کیفیت جنین رابطه معنی‌داری مشاهده نشد. با توجه به این نتایج می‌توان ادعا کرد که پارامتر کمبود پروتامین اسپرم فقط در فرآیند لقاح موثر است و رشد و تکامل بعدی جنین مستقل از آن صورت می‌گیرد.

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان دریافت که مورفولوژی زیگوت انسان جهت انتخاب و انتقال جنین با کیفیت بالا قابل توجه و ارزشمند است اما به تنهایی کافی نیست و ارزیابی وضعیت تسهیم می‌تواند یک پارامتر مکمل باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتایج طرح تحقیقاتی شماره ۸۰۰-۸ پژوهشکده رویان است و نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از پزشکان و پرسنل مرکز باروری و ناباروری اصفهان، مسئولان پژوهشکده رویان و دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ابراز می‌دارند.

مطالعه حاضر نشان داد بین ضریب تسهیم و کیفیت جنین در روز سوم با اندازه پیش‌هسته‌ها رابطه معنی‌داری وجود ندارد که این نتایج با یافته‌های به دست آمده از مطالعات ادسون برگزو و سالومتر هم‌خوانی دارد. در حالی که با نتایج اسکات و تزاریک متفاوت است و احتمال داده می‌شود اختلاف در نتایج مطالعه حاضر با مطالعات قبلی به دلیل تفاوت در روش انجام تحقیق باشد. در مطالعات گذشته هر کدام از تخمک‌ها پس از تلقیح به صورت جداگانه در محیط کشت رشد داده و کیفیت زیگوت‌ها و روند تسهیم آن بررسی شده است و نتایج آن با مورفولوژی پیش‌هسته‌های همان زیگوت قابل مقایسه بوده است. در حالی که در مطالعه حاضر به دلیل محدودیت‌های اخلاقی و حفظ حقوق بیماران، همه تخمک‌های متعلق به یک زوج به صورت گروهی در هر قطره در محیط کشت قرار داده می‌شد و با توجه به اینکه یک زیگوت هم مانند یک سلول طبیعی دارای ترشحات پاراسلولی است و این واسطه‌های شیمیایی در یک فضای محدود رها می‌شوند بنابراین ترشحات شیمیایی هر سلول زیگوت می‌تواند رشد و تکامل زیگوت دیگر را تحت تاثیر قرار دهد (۳۴).

چون همه زیگوت‌ها با هم کشت داده می‌شدند این امکان وجود نداشت که بتوان تشخیص داد که جنین حاصله در روز سوم ناشی از کدام زیگوت بوده است. از طرفی ارزیابی تزاریک در فاصله زمانی ۲۰-۱۲ ساعت بعد از لقاح صورت گرفته است اما در مطالعه سالومتر و نیز تحقیق حاضر بررسی زیگوت‌ها ۲۰-۱۸ ساعت بعد از لقاح بوده است و با توجه به تغییرات تدریجی پیش‌هسته‌ها و اجسام پیش‌هستیکی درون آن نمی‌توان گفت که الگوهای هر دو مطالعه یکسان بوده است. همچنین باید به این نکته توجه شود که ژنوم جنین در مرحله ۸-۴ سلولی فعال می‌شود و در صورتی که ناهنجاری کروموزومی وجود داشته باشد از این مرحله به بعد رشد جنین را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۳۲). پس می‌توان انتظار داشت جنینی که در مرحله پیش‌هسته‌ای الگوی مناسبی دارد در روز سوم کیفیت خوبی نداشته باشد.

معیار دیگری که در مرحله پیش‌هسته‌ای، جهت تشخیص جنین خوب به کار برده می‌شود مورفولوژی اجسام پیش‌هستیکی است. بررسی‌های روزانه و در زمان‌های مختلف پیش‌هسته‌ها نشان می‌دهد که شکل و نحوه قرارگیری اجسام پیش‌هستیکی در روزهای مختلف متفاوت است. این تغییرات ادامه می‌یابد تا زمانی که سرانجام هستک را ایجاد کنند. با توجه به این تغییرات دینامیک در اجسام پیش‌هستیکی به نظر می‌رسد که آنها فازهای مختلفی را طی کرده و نهایتاً درون هستک به هم رسیده و پلاریزه می‌شوند (۳۵).

References

1. Land JA, Evers JLH. Risks and complication in assisted reproduction techniques: Report of an ESHRE consensus meeting. Human Reproduction, 2003; 18: 455-457

2. Vayena E, Rowe PJ, Peterson HB. Assisted reproduction technology in developing countries: Why should we care? Fertility and Sterility, 2002; 78(1): 13-15
3. Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards

- RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in in-vitro fertilization and embryo transfer program. *Human Reproduction*, 1992 ; 7: 117-119
4. Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfer the day following oocyte retrieval. *Human Reproduction*, 1998; 13:1003-1013
5. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human Reproduction*, 1999; 14: 1318-1323
6. Ebner T, Moster M, Yaman D , Feichtinger O , Hartl J, Tews G. Elective transfer of embryo selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy . *Fertility Sterility*, 1999; 72: 599-603
7. Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Human Reproduction*, 1997; 12: 1531-1536
8. Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Human Reproduction*, 2000; 15: 2190-2196
9. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. Characterization of a top quality embryo, a step towards single- embryo transfer. *Human Reproduction*, 2000; 14: 2345-2349
10. Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and Implantation. *Human Reproduction*, 2000; 15: 2394-2403
11. Lundqvist M, Johansson U, Lundkvist O, Milton K, Westin C, Simberg N. Dose pronuclear morphology and/ or cleavage rate predict embryo implantation potential? *Reproductive Bio Medicine Online*, 2001; 2: 12-16
12. Nagy Zsolt P, Dozortsev D, Diamond M, Rienzi L, Ubaldi F, Abdelmassih R, Greco E. Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increase implantation rates. *Fertility and Sterility*, 2003; 80: 67-74
13. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Mumcu A, Nuhoglu A. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Human Reproduction*, 2001; 16: 2357-2361
14. Dale B, Fiorentino A, de Simone ML, di Matteo L, di Frega AS, Wilding M, Fehr P, Bassan E, Lo Giudice C, Maselli A, Cappiello F, Zullo F. Zygote versus embryo transfer: a prospective randomized multicenter trail. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2002; 19: 456-461
15. Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reproductive Biomedicine Online*, 2003; 6: 201-214
16. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghadam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia*, 2003; 35: 238-43
17. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2001, 18: 219-225
18. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana A: Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1996; 11: 837-43
19. Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Mardani M: The Role of Sperm Chromatin Anomalies on the Outcome of Assisted Reproductive Techniques. *Yakhteh*, 2006; 28: 206-266
20. Nasr-Esfahani MH, Razavi SH , Mardani M, Mafi A, Moghadam A. Effect of Human Sperm Chromatin Anomalies on Fertilization Outcome Post ICSI. *Yakhteh*, 2004; 21: 5-10
21. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Andrology*, 2002; 23(1): 1-8
22. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reproductive Bio Medicine Online*, 2005 Aug; 11(2): 198-205
23. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Human Reproduction*, 2005; 20: 185-90

24. Rosenbusch BE. Frequency and patterns of premature sperm chromosome condensation in oocytes failing to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *J Assisted Reproduction Genetics*, 2000; 17(5): 253-259
25. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1999
26. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertility Sterility*, 2003; 80(2): 341-349
27. Effy Vayena, Patrik J, Rowe, Herbert B. Peterson. Assisted reproduction technology in developing countries: Why should we care? *Fertility and Sterility*, 2002; 78(1): 13-15
28. Montag M, van der Ven H. German Pronuclear Morphology Study Group. Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: Results of prospective multicenter study. *Human Reproduction*, 2001; 16: 2384-2389
29. De Vos A, Van De Veld H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 2003; 79(1): 42-48
30. Ludwig M, Schopper B, AL-Hasani S, Diedrich K. Clinical use of pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact of pregnancy rates under the condition of the German embryo protection law. *Human Reproduction*, 2000; 15: 325-329
31. Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction*, 2002; 17: 184-189
32. Edson Borger Jr, Lia Mara Rossi, Leila M, Farah S. Patricia Guilherme. The impact of pronuclear orientation to select chromosomally normal embryo. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2005; 22(3): 107-114
33. Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Human Reproduction*, 2001; 16(10): 2177-2181
34. Watson AJ, Hogan A, Wimer KE, Schultz GA. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Molecular Reproductive Development*, 1992; 31: 87-95
35. Grillo JM, Vasserot M, Gannerre M, Vitry G, Stahl A. Nucleolar changes in human embryo during the preimplantation stage. Activation of ribosomal genes during the nucleogenesis. *Bio Cell*, 1999; 72: 201-209
36. Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongieres C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote elevation: an efficient tool for embryo selection. *Human Reproduction*, 2000; 15: 2591-2597
37. Coskun S, Hellani A, Jarodi K, AL-Mayman H. Nucleolar precursor body distribution in pronuclei is correlated to chromosomal abnormalities in embryos. *Reproductive Bio Medicine On line*, 2003; 7(1): 86-90
38. Vilska M, Tiitinen A, Hyden-Granskog C. Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth. *Human Reproduction*, 1999; 14: 2392-2395
39. Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Human Reproduction*, 2003; 18: 821-825