

Klivaj Evresi ve Blastokist Embriyo Transferlerinin Over Rezervine Göre Karşılaştırılması

Comparison of Cleavage Stage Versus Blastocyst Embryo Transfer with Regard to Ovarian Reserve

Zehra Sema ÖZKAN, Mustafa EKİNCİ, Hüseyin TİMURKAN, Ekrem SAPMAZ

Firat Üniversitesi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Elazığ

Özet

Amaç: İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) siklusuna alınan hastaların over rezervlerine göre klivaj evresi ile blastokist tek embriyo transferi (ET) sonrası gebelik oranları arasında fark olup olmadığını araştırmak.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada hastanemiz Tüp Bebek Merkezi'nde ICSI-ET siklusuna alınan 200 çiftin tedavi sonuçları incelendi. Tubal faktör, azalmış over rezervi ve açıklanamayan kısırlık tanısı konan, GnRH antagonisti ile hipofizer down-regülasyonu yapılan toplam 78 çift toplanan oosit sayısına (TOS) göre azalmış ve normal over rezervli şekilde iki gruba ayrıldı. Bu gruplar ET günü, ET günü grade 1 embriyo oranı, implantasyon ve gebelik oranları açısından kıyaslandı.

Bulgular: Açıklanamayan kısırlık (n=41), azalmış over rezervi (n=29) ve tubal faktör (n=8) tanılı 78 hastanın ortalama yaş, beden kitle indeksi (BKİ), menstrual siklusun üçüncü günü FSH ve estradiol seviyeleri sırasıyla 31.5 ± 5.2 yıl, 24.9 ± 5.3 kg/m², 6.9 ± 3.4 IU/mL ve 40.4 ± 16.6 pg/mL idi. TOS <8 olan 40 hasta azalmış over rezervi grubunda (AOR); TOS 8-12 olan 38 hasta ise normal over rezervi grubunda (NOR) idi. AOR'de ET'nin %67.5'i klivaj evresinde yapılırken; NOR'de ET'nin %86.8'i blastokist evresinde yapıldı (p<0.01). Fakat gruplar arasında ET günü grade1 embriyo, fertilizasyon, gebelik ve implantasyon oranları açısından anlamlı bir fark gözlenmedi.

Sonuç: İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu-ET sikluslarında azalmış over rezervli hastalar, normal rezervli hastalara göre embriyo sayısındaki azlıktan ileri gelen dezavantajlarını iyi kalitede klivaj evresi ET ile ortadan kaldırebilmektedir.

Anahtar sözcükler: Azalmış over rezervi; blastokist; grade1 embriyo; klivaj evresi.

Summary

Background: To compare the pregnancy rates of patients experiencing cleavage stage versus blastocyst single embryo transfer (ET) with regard to ovarian reserve.

Methods: This study was conducted with analysis of 200 ICSI-ET cycles performed in our IVF Center. A total of 78 ICSI-ET cycles down-regulated with GnRH antagonists were included in the study and the etiology of infertility was as follows: tubal factor (n=8), decreased ovarian reserve (n=29), and unexplained infertility (n=41). The population was divided into two groups according to the number of retrieved oocytes (NRO). The groups were compared for the parameters of ET day, embryo quality, grade1 embryo rate, pregnancy rate and implantation rate.

Results: The 78 women were divided into two groups as follows: poor responders (NRO <8, n=40) and normoresponders (NRO=8-12, n=38). The mean age, body mass index (BMI), 3-day FSH, and estradiol levels of study population were 31.5 ± 5.2 years, 24.9 ± 5.3 kg/m², 6.9 ± 3.4 IU/mL and 40.4 ± 16.6 pg/mL, respectively. In poor responders, the great extent of ET (67.5%) was performed at cleavage stage, but in normoresponders the majority of ET (86.8%) was performed at blastocyst stage (p<0.01). There was no significant difference between the groups for the parameters of grade1 embryo rate, fertilization rate, pregnancy rate, and implantation rate.

Conclusion: Our results indicate that the poor responder patients with good grade cleavage stage embryo have no disadvantage in ICSI-ET cycles compared to normoresponders with blastocyst embryo.

Key words: Decreased ovarian reserve; blastocyst; grade1 embryo; cleavage stage.

İletişim: Dr. Zehra Sema Özkan.
Firat Üniversitesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve
Doğum Anabilim Dalı, 23119 Elazığ
Tel: 0424 - 237 11 80

Başvuru tarihi: 01.07.2013
Kabul tarihi: 31.07.2013
Online baskı: 17.04.2014
e-posta: zehrasema@yahoo.com



Giriş

Menstrual siklusun üçüncü günü (D3) bakılan folikül stimulan hormon (FSH) düzeyleri 9 mIU/mL'nin üstünde çıkan ve in vitro fertilizasyon (IVF) sürecinde uygulanan kontrollü overyan hiperstimülasyon (KOH) tedavisine beklenen yanıtı vermeyen hastalar kötü cevaplı olarak kabul edilir.^[1,2] Bu hastaların normal cevaplılara nazaran gebelik ve canlı doğum oranlarının daha düşük olduğu düşünülmektedir.^[2] Kötü cevaplı hasta için kesinleşmiş bir tanım kriteri olmasa da klasik IVF'de toplanan oosit sayısının azlığı ile düşük gebelik oranları arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.^[3,4] Çoğul gebeliklerin önüne geçmek için getirilen elektif tek, koşullu çift embriyo transferi (ET) kuralının kötü cevaplı hastalarda gebelik şansını azaltabileceği düşünülebilir. Bazı araştırmacılar kötü cevaplı hastalarda çift ET'nin çoğul gebelik oranını bir miktar artırmakla beraber, canlı doğum oranlarını tek ET'ye göre anlamlı olarak artırdığını bildirmektedirler.^[2] Bazı araştırmacılar da zorunlu tek ET sonrası gebelik ve canlı doğum oranlarının en az elektif tek ET kadar iyi olduğunu bildirmektedirler.^[5] Bir de transfer edilen embriyonun klivaj veya blastokist evresinde olmasına göre gebelik oranlarının değiştiğini belirten çalışmalar bulunmaktadır.^[6,7]

Bu çalışmada kötü cevaplı hastalar ile iyi cevaplı hastaların ET dönemine göre gebelik oranlarında bir fark olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Hastalar ve Yöntem

Bu geriye dönük çalışmada hastanemiz Tüp Bebek Ünitesi'ne Ocak 2012-Aralık 2012 tarihleri arasında başvuran ve kontrollü overyan hiperstimülasyon-int-rasitoplazmik sperm injeksiyonu (KOH-ICSI) siklusuna alınan 200 çiftin tedavi sonuçları incelendi. Embriyo kalitesine etki edeceğini düşündüğümüz erkek faktörü, endometriozis ve anovulasyon endikasyonlu çiftler çalışma dışı tutuldu. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) antagonisti ile hipofizer down-regülasyon yapılan 78 çift çalışmaya dahil edildi. Bu çiftlerin etiyolojisi dağılımı ise tubal faktör (n=8), azalmış over rezervi (n=29) ve açıklanamayan infertilite (n=41) idi.

Ünitemizde çiftlere yapılan infertilite tetkikleri şöyle sıralanabilir: erkekte üç-beş günlük cinsel perhiz sonrası spermogram tahlili; kadında menstrüel siklusun üçüncü günü (D3) yapılan jinekolojik muayene, transvajinal ultrasonografi, folikül stimulan hormon (FSH), lüteinizan hormon (LH), tiroid stimulan hormon (TSH), estradiol (E2) ve prolaktin serum düzeylerine bakılma-

sıdır. Uterin kavite ve tubal pasajın değerlendirimi için yerine göre histerosalpingografi veya ofis histeroskopi yapıldı. Yapılan incelemelerin ardından KOH-ICSI siklusuna alınan hastalar GnRH antagonisti protokolüne göre stimülasyona alındı. Stimülasyona hastanın over kapasitesine göre rekombinant FSH ile adetini ikinci ya da üçüncü günü başlandı. En az üç tane 17 mm ve üstü folikül varlığında final maturasyon için rekombinant human koryonik gonadotropin (hcG) injeksiyonu uygulandı. HcG uygulamasının 35/ 36. saatinde oosit pick-up (OPU) işlemi ile yumurtalar toplandı. Ardından ejakulat spermeleri ile ICSI işlemi yapıldı. Klivaj embriyosu ya da blastokist transferi yapıldı. Kadın yaşı, infertilite süresi, over kapasitesi, stimülasyon süresi, spermogram özellikleri, toplanan oosit sayısı, matür oosit sayısı, fertilize oosit sayısı, embriyo kalitesi, ET günü iyi kalitede embriyo oranı ve gebelik oranları incelendi. Çalışma popülasyonu toplanan oosit sayısına (TOS) göre iki gruba ayrıldı: TOS <8 olan 40 çift azalmış over rezervli (AOR); TOS=8-12 olan 38 çift de normal over rezervli (NOR) olarak gruplandırıldı. İki grubun ET günü, transfer günü iyi kalitede embriyo sayısı, iyi kalitede embriyo oranı, gebelik ve implantasyon oranları kıyaslandı. Embriyo kalitesi oosit toplanmasını takip eden 72-120. saatlerde değerlendirildi. Klivaj embriyosu için blastomer büyüklüğü, sayısı ve anükleer fragmentasyon miktarı ve beşinci gün için blastokist formasyonu kaliteyi belirlemede kullanıldı. Veriler SPSS 15.0 paket programı (Inc., Chicago, USA) kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı. Sürekli değişkenler datanın dağılım özelliğine göre Student's t-test veya Mann-Whitney U-test ile kategorik değişkenler ise ki kare veya Fisher exact test ile değerlendirildi. P<0.05 istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Çalışma popülasyonunun ortalama kadın yaşı, beden kitle indeksi (BKİ), D3 FSH ve estradiol seviyeleri sırasıyla 31.5±5.2 yıl, 24.9±5.3 kg/m², 6.9±3.4 IU/mL ve 40.4±16.6 pg/mL idi. Grupların IVF tedavi özellikleri Tablo 1'de sunuldu. Gruplar arasında vücut kitle indeksi, D3 FSH, estradiol seviyeleri ve stimülasyon süreleri açısından anlamlı bir fark yoktu. AOR grubunda kadın yaşı ve toplam gonadotropin dozu NOR'den anlamlı yüksek iken; hcg günü estradiol düzeyi, hcg günü endometrial kalınlık ise anlamlı daha düşük idi. İki grupta fertilizasyon oranları (fertilizasyon oranı=fertilize oosit sayısı/matür oosit sayısı) benzer idi (%79 vs %81, p=0.66). ET günü iyi kalitede embriyo sayısı NOR'de yüksek iken; iyi kalitede embriyo yüzdesi aç-

Tablo 1. Over rezervine göre grupların IVF parametrelerinin kıyaslanması

Parametre	AOR (n=40)	NOR (n=38)	p
Kadın yaşı (yıl)	33.2±5.1	29.7±4.8	<0.01
Beden kitle indeksi (kg/m ²)	25.1±6.3	24.8±4.1	0.78
D3 FSH (IU/mL)	7.6±4.4	6.2±1.7	0.07
D3 Estradiol (pg/mL)	42±17	38±16	0.35
Stimülasyon süresi (gün)	8.7±2.4	8.5±1.1	0.69
Toplam gonadotropin dozu (ünite)	3603±1071	2542±1117	<0.01
Hcg günü estradiol (pg/mL)	1163±637	2509±1117	<0.01
Hcg günü endometrial kalınlık (mm)	9.8±2.5	11.2±2.3	0.01
Fertilizasyon oranı (%)	79	81	0.66
ET günü iyi kalitede embriyo sayısı	1±0.9	2±1	<0.01
ET günü iyi kalitede embriyo yüzdesi	30±26	27±16	0.59
Klivaj embriyosu transfer oranı (%)	67.5	13.2	<0.01
Blastokist transfer oranı (%)	32.5	86.8	<0.01
İmplantasyon oranı (%)	29.9	27.8	0.51
Gebelik oranı (%)	40	60	0.07

IVF: İn vitro fertilizasyon; AOR: azalmış over rezervli; NOR: Normal over rezervli; D3: Menstrüel siklusun üçüncü günü; FSH: Folikül stimulan hormon; Hcg: Human koryonik gonadotropin; ET: Embriyo transferi.

sından iki grup arasında anlamlı bir fark yoktu (Tablo 1). Blastokist transfer oranı NOR'de AOR'den daha yüksek idi (%86.8 vs %32.5, $p<0.01$). Gebelik (%40 vs %60, $p=0.07$) ve implantasyon oranları (%29.9 vs %27.8, $p=0.51$) da her iki grupta benzer idi (Tablo 1).

Tartışma

Çalışmamızda IVF uygulamalarında gebelik şansını embriyo transfer gününün değil, transfer edilecek embriyonun kalitesinin etkilediğini gözlemledik. Over rezervi düşük hastalarda blastokist evresine gidilemese de klivaj evresindeki iyi kalitede bir embriyonun transferi gebelik şansını over rezervi normal olan hasta ile benzer yapmaktadır. Çalışmamızın iki limitasyonu bulunmaktadır. Birincisi popülasyonun küçük olması, ikincisi ise over ve sperm kökenli bias çıkartabilecek tüm faktörleri dışlayabilmek için sadece tubal faktör infertilitesinden oluşacak bir popülasyon oluşturamamızdır. Klivaj evresinden ziyade blastokist transferinde implantasyon oranının daha yüksek olduğu, bunun da embriyo ve endometrium arasındaki senkronizasyondan ileri geldiği öne sürülmektedir.^[8] Glujovsky ve ark.^[7] yaptıkları metaanalizde 50 çalışma içinden randomize ileriye yönelik özellikle blastokist ile klivaj evresi ET'yi mukayese eden 23 çalışmadaki 1510 kadının tedavi sonuçlarını incelemişlerdir. Klinik gebelik

oranları klivaj evresinde %38.6 ve blastokist evresinde %41.6 şeklinde benzer çıkarken; canlı doğum oranı ise bir miktar blastokist ET lehine tespit edilmiştir (%31 ve %38.8). Klivaj embriyosu veya blastokist transferlerinde abortus oranlarında bir fark gözlenmemiştir. Bu 23 çalışmanın sadece dördünde 266 kadında kümülatif gebelik oranları hesaplanmış ve klivaj evre transferlerinde oran anlamlı daha yüksek (%56.8 ve %46.3) gözlenmiştir. Kümülatif gebelik oranlarındaki bu yüksekliğin klivaj evresinde embriyo dondurulması ve donma-çözme ET'ye gitme oranının daha yüksek olmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Bir grup araştırmacı ET'yi beşinci güne götürmeye çalışmanın transfer edilecek ve dondurulabilecek embriyo bulamama riski taşıdığını ifade etmektedir.^[9] Guerif ve ark.^[10] OPU sonrası ikinci gün iyi kalitede embriyosu olmayan 36 yaş altındaki 450 kadında iki klivaj embriyosu ile tek blastokist transferini karşılaştırmışlardır. ET gitme oranını blastokist grubunda anlamlı daha düşük bulurken; OPU başına canlı doğum oranlarını benzer bulmuşlardır. Blastokist grubunda çoğul gebelik oranları anlamlı daha düşük ve blastokist dondurma oranları anlamlı daha yüksek rapor edilmiştir. Çalışmamızda transfer günü iyi kalitede embriyo sayısı AOR grubunda daha düşük iken, iyi kalitede embriyo yüzdesi ve gebelik oranları gruplar arasında farklılık göstermiyordu. Be-

şinci gün transferi özellikle tek ET yapılacak hastalar için önerilmektedir.^[11,12] Tong ve ark.^[6] Çinli kadınlarla yaptıkları çalışmada, klivaj embriyosu ve blastokist transferi yapılan hastaların implantasyon ve klinik gebelik oranlarını karşılaştırmışlardır. İmplantasyon (%31.8 ve %31.2, $p>0.05$) ve klinik gebelik (%41.07 ve %47.08, $p>0.05$) oranlarında bir fark gözlememişlerdir. Ancak blastokiste giden sikluslarda dondurulan blastokistlerin ardışık yapılan donma-çözme ET ile klinik gebelik (%56.8 ve %41.07) ve implantasyon (%47 ve %31.8) oranlarını taze blastokist transferine göre anlamlı artırdığını belirtmişlerdir. Otuz beş yaş altı hastalarda kümülatif gebelik oranı taze ve donma-çözme blastokist ve klivaj embriyo ardışık transferlerinde karşılaştırıldığında, blastokist evresinde anlamlı yüksek (%70.1 ve %51.8, $p<0.05$) gözlenmiştir.

Hemmings ve ark.^[13] yaptıkları çalışmada in vitro ortamda oositlerin aminoasit döngüsünün hasta yaşı, over rezervi ve gonadotropin türünden etkilendiğini bildirmişlerdir. Polikistik morfolojili over ile normal over, 35 yaş altı ile üstü kadın yaşı ve rekombinant FSH ile human menopozal gonadotropin stimülasyonundan elde edilen oosit kaliteleri arasında fark olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda da polikistik overli hastaları oosit kalite farkından ötürü çalışma dışı tutuk ve stimülasyon ajanı olarak sadece rekombinant FSH kullanılan hastaları çalışmaya dahil ettik. Çalışmadaki tüm hastaların yaşı 35'in altında idi.

Laboratuvar koşullarının embriyonik gelişimi etkilediği ve bunun da IVF sonuçlarına yansıdığı bildirilmektedir. Calzi ve ark.^[14] yaptıkları çalışmada düşük oksijen konsantrasyonlarında kültüre edilen 224 ICSI ve 82 IVF oositinin fertilizasyon ve klivaj evresine ilerleme oranlarının atmosferik oksijene maruz bırakılan 273 ICSI ve 84 IVF oositinin oranlarından daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Dal Canto ve ark.^[15] da klivaja daha erken dönemde giren embriyoların blastokiste ilerleme ve implante olma yeteneğinin daha yüksek olduğunu ve transfere gidecek embriyoyu belirlemek adına konvansiyonel ikinci ve üçüncü gün embriyo kontrolünü yapmanın uygun olacağını bildirmişlerdir. Keltz ve ark.^[16] üçüncü gün kalitesi iyi olmayan fragmanlı embriyoları defragmente etmenin, blastokiste ilerleme açısından bir iyileştirme getirmediğini bildirmiştir.

İn vitro fertilizasyon/ ICSI tekil gebeliklerinin perinatal akıbetlerine dair yapılan çalışmaların bir kısmı klivaj embriyosu ve blastokist transferi arasında bir fark gözlenmediğini bildirirken, bir kısmı da blastokist

gebeliklerinde preterm eylemde artış olduğunu bildirmektedir.^[17-19] Bu artışın uzun in vitro kültür medyumuna maruziyetten ya da IVF yapılan hastanın hem infertilite etiyolojisi hem de kişisel özelliklerinden ileri gelebileceği bildirilmiştir.^[19] Çalışmamızda gebe kalan hastaların obstetrik takipleri hastanemizde yapılmadığı için ve telefonla her hastaya ulaşılamadığı için perinatal akıbet adına data sunamadık.

Yazbeck ve ark.^[20] ICSI sonrası iki aşamalı ikinci/üçüncü gün klivaj ET + beşinci gün blastokist transferini, sadece ikinci/üçüncü gün yapılan klivaj ET ile mukayese ettiklerinde canlı doğum oranlarının iki aşamalı ET'de daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu iki aşamalı ET ile hastalarda siklus kaybının önüne geçme avantajı olduğunu da bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, çalışmamızda IVF'de transfer edilen embriyo ister klivaj embriyosu ister blastokist olsun, gebelik oranını embriyonun transfer gününden ziyade kalitesinin etkilediğini tespit ettik. Toplanan oosit sayısı düşük olan hastalarda iyi kalitede klivaj evre ET yapıp, blastokist transferine gidilmemesi bir dezavantaj getirmemektedir.

Çıkar Çatışması

Yazar(lar) çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Kaynaklar

1. Loutradis D, Elsheikh A, Kallianidis K, Drakakis P, Stefanidis K, Milingos S, et al. Results of controlled ovarian stimulation for ART in poor responders according to the short protocol using different gonadotrophins combinations. Arch Gynecol Obstet 2004;270(4):223-6.
2. Jonsdottir I, Lundin K, Bergh C. Double embryo transfer gives good pregnancy and live birth rates in poor responders with a modest increase in multiple birth rates: results from an observational study. Acta Obstet Gynecol Scand 2011;90(7):761-6.
3. Keay SD, Liversedge NH, Mathur RS, Jenkins JM. Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation. Br J Obstet Gynaecol 1997;104(5):521-7.
4. Ulug U, Ben-Shlomo I, Turan E, Erden HF, Akman MA, Bahceci M. Conception rates following assisted reproduction in poor responder patients: a retrospective study in 300 consecutive cycles. Reprod Biomed Online 2003;6(4):439-43.
5. Straughen JK, Salihu HM, Keith L, Petrozzino J, Jones C. Obligatory versus elective single embryo transfer in in vitro fertilization. A population-based analysis of data from the U.K. Human Fertilisation and Embryology Authority. J Reprod Med 2013;58(3-4):95-100.

6. Tong GQ, Cao SR, Wu X, Zhang JQ, Cui J, Heng BC, et al. Clinical outcome of fresh and vitrified-warmed blastocyst and cleavage-stage embryo transfers in ethnic Chinese ART patients. *J Ovarian Res* 2012;5(1):27.
7. Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;7:CD002118.
8. Conaghan J, Chen AA, Willman SP, Ivani K, Chenette PE, Boostanfar R, et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertil Steril* 2013;100(2):412-9.e5.
9. Blake D, Proctor M, Johnson N, Olive D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(4):CD002118.
10. Guerif F, Frapsauce C, Chavez C, Cadoret V, Royere D. Treating women under 36 years old without top-quality embryos on day 2: a prospective study comparing double embryo transfer with single blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2011;26(4):775-81.
11. Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(4):CD002118.
12. Zander-Fox DL, Tremellen K, Lane M. Single blastocyst embryo transfer maintains comparable pregnancy rates to double cleavage-stage embryo transfer but results in healthier pregnancy outcomes. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2011;51(5):406-10.
13. Hemmings KE, Maruthini D, Vyjayanthi S, Hogg JE, Balen AH, Campbell BK, et al. Amino acid turnover by human oocytes is influenced by gamete developmental competence, patient characteristics and gonadotrophin treatment. *Hum Reprod* 2013;28(4):1031-44.
14. Calzi F, Papaleo E, Rabellotti E, Ottolina J, Vailati S, Viganò P, et al. Exposure of embryos to oxygen at low concentration in a cleavage stage transfer program: reproductive outcomes in a time-series analysis. *Clin Lab* 2012;58(9-10):997-1003.
15. Dal Canto M, Coticchio G, Mignini Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, et al. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online* 2012;25(5):474-80.
16. Keltz M, Fritz R, Gonzales E, Ozensoy S, Skorupski J, Stein D. Defragmentation of low grade day 3 embryos resulted in sustained reduction in fragmentation, but did not improve compaction or blastulation rates. *Fertil Steril* 2010;94(6):2406-8.
17. Fernando D, Halliday JL, Breheny S, Healy DL. Outcomes of singleton births after blastocyst versus nonblastocyst transfer in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2012;97(3):579-84.
18. Dar S, Librach CL, Gunby J, Bissonnette F, Cowan L; IVF Directors Group of Canadian Fertility and Andrology Society. Increased risk of preterm birth in singleton pregnancies after blastocyst versus Day 3 embryo transfer: Canadian ART Register (CARTR) analysis. *Hum Reprod* 2013;28(4):924-8.
19. Källén B, Finnström O, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG, Olausson PO. Blastocyst versus cleavage stage transfer in in vitro fertilization: differences in neonatal outcome? *Fertil Steril* 2010;94(5):1680-3.
20. Yazbeck C, Ben Jamaa N, Hazout A, Cohen-Bacrie P, Junca AM, Rougier N. Advantages of the two-step embryo transfer strategy in human IVF/ICSI cycles. *Zygote* 2013;21(1):77-83.