

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.01.0106

## 激光辅助孵化对种植失败患者冻融胚胎移植妊娠结局的影响

路新梅<sup>△</sup>, 徐晨<sup>△</sup>, 王亮, 孙宁霞, 章青, 关彭芳, 李文\*

第二军医大学长征医院生殖医学中心, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 探讨激光辅助孵化(laser-assisted hatching, LAH)对种植失败患者冻融胚胎移植(frozen-thawed embryo transfer, FET)周期妊娠结局的影响。**方法** 2012年5月至2013年12月在本中心接受辅助生殖治疗的97例胚胎种植失败患者, 选取其124个FET周期并随机分为两组: 孵化组(61个周期), 胚胎移植前行LAH; 未孵化组(63个周期), 胚胎移植前行未行辅助孵化。比较两组的临床妊娠率和胚胎种植率以及流产率、多胎率。**结果** 孵化组的临床妊娠率(47.5%)、胚胎种植率(29.2%)均高于未孵化组(30.2%和19.0%), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。流产率、多胎率等结局指标在两组间的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** LAH可明显提高种植失败患者FET周期临床妊娠率和胚胎种植率, 改善临床结局。

**[关键词]** 冻融胚胎移植; 激光辅助孵化; 种植失败; 妊娠结局

**[中图分类号]** R 711.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)01-0106-05

### Effect of laser-assisted hatching on outcome of frozen-thawed embryo transfer for patients with previous repeated implantation failure

LU Xin-mei<sup>△</sup>, XU Chen<sup>△</sup>, WANG Liang, SUN Ning-xia, ZHANG Qing, GUAN Peng-fang, LI Wen\*

Reproductive Medicine Center, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To determine whether laser-assisted hatching (LAH) can improve the clinical outcome of frozen-thawed embryo transfers (FET) for patients with previous repeated implantation failure. **Methods** A total of 97 infertility patients with previous repeated failure, who received assisted reproductive therapy in our in-vitro fertilization(IVF) center from May 2012 to December 2013, were included in this study. A total of 124 FET cycles were randomly divided into LAH group (LAH was performed before embryo transplantation,  $n=61$ ) and non-assisted hatching group (LAH was not performed before embryo transplantation,  $n=63$ ). The clinical pregnancy rate, implantation rate, abortion rate and multiple pregnancy rate were compared between the two groups. **Results** The pregnancy rate (47.5% vs 30.2%,  $P < 0.05$ ) and implantation rate (29.2% vs 19.0%,  $P < 0.05$ ) in the assisted hatching group were both significantly higher than those in the non-assisted hatching group. There were no significant differences between the two groups in abortion rate or multiple pregnancy rate ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The LAH can increase the pregnancy and implantation rates and improve the outcome of IVF-ET in frozen-thawed embryo transfer cycles for patients with previous repeated failure.

**[Key words]** frozen-thawed embryo transfers; laser-assisted hatching; implantation failure; pregnancy outcome

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(1):106-110]

随着辅助生殖技术的不断发展, 虽然体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)的临床妊娠率已达到30%~50%<sup>[1]</sup>。但是, 较低的胚胎种植率(不到25%)是当前生殖领域的一大难题<sup>[2]</sup>。为改善IVF-ET的临床

结局, 生殖医学中心多通过提高可用胚胎率、移植多个胚胎、将剩余的胚胎冷冻保存以增加移植的次数等方法来提高妊娠率。但这同时也增加了多胎妊娠和卵巢过度刺激综合征(OHSS)的风险。非优质胚胎和较差的子宫内膜是导致胚胎种植失败的主要原

**[收稿日期]** 2015-05-08 **[接受日期]** 2015-07-29

**[基金项目]** 上海市科委产学研重点专项(14DZ1942502)。Supported by Key Program of Science and Technology Commission of Shanghai (14DZ1942502)

**[作者简介]** 路新梅, 硕士, 助理研究员。E-mail: lxmsky2@163.com; 徐晨, 硕士生, 主治医师。E-mail: vino19@163.com

<sup>△</sup>共同第一作者(Co-first authors)。

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81886715, E-mail: lyyliwen@sina.com

因。然而,有研究表明,囊胚期胚胎孵化障碍也是影响胚胎种植的一个重要因素<sup>[3]</sup>。

为了提高 IVF-ET 的种植率和临床妊娠率,通过人为手段使得透明带破裂以帮助胚胎孵出的技术就是辅助孵化 (assisted hatching, AH) 技术,该技术最早应用于 1990 年。已有大量实施该技术改善临床结局的报道。Chao 等<sup>[4]</sup>认为, AH 技术可提高反复失败者和高龄患者的临床妊娠率和种植率。Sallam 等<sup>[5]</sup>报道,不良预后的患者实施胚胎 AH 技术可提高妊娠率和种植率。Ali 等<sup>[6]</sup>认为 AH 技术可提高胚胎的种植潜能。Martins 等<sup>[7]</sup>证实 AH 技术可显著提高反复种植失败和冻融胚胎移植 (frozen-thawed embryo transfer, FET) 的临床妊娠率,并不能改善鲜胚移植的临床结局。Nadir 等<sup>[8]</sup>研究表明, AH 操作并不能改善子宫内膜异位患者的胚胎种植率。虽然, AH 技术应用已 20 多年,但是,该技术是否可被作为辅助生殖实验室的一项常规操作至今存在争议,在各个生殖中心的应用指征仍未形成统一的共识。因此,为了研究 AH 技术在种植失败患者 FET 周期中的应用价值,本研究在患者知情同意的前提下,通过前瞻性随机研究,对第二军医大学长征医院生殖医学中心反复种植失败患者的冻融胚胎周期行激光辅助孵化 (laser-assisted hatching, LAH), 探讨其在结局改善中的作用。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 自 2012 年 5 月起,根据纳入标准选取 100 例于第二军医大学长征医院生殖医学中心治疗的患者作为研究对象。纳入条件:(1)年龄 $\leq 36$ 岁;(2)胚胎种植失败次数 $\geq 2$ ;(3)本次移植当日子宫内膜厚度 $\geq 8$  mm;(4)排除输卵管积水、子宫内膜异位症、子宫肌瘤等疾病;(5)移植当日早晨解冻胚胎,且全部为 D3 卵裂期胚胎,胚胎冷冻方式均为玻璃化冷冻。将符合以上条件的患者按照周期顺序依次进行编号,编号为奇数者胚胎移植前行 LAH(孵化组),编号为偶数者胚胎移植前未行 LAH(未孵化组)。截止 2013 年 12 月止,排除囊胚期复苏移植周期 39 个以及解冻后无胚胎移植的周期 3 个,D3 卵裂期复苏胚胎移植周期共 97 例患者的 124 个周期被纳入研究,其中孵化组 61 个周期,未孵化组 63 个

周期。比较 2 组的临床妊娠率、胚胎种植率、流产率和多胎率等。本研究经医院伦理委员会批准,夫妇双方自愿并签署知情同意书。

1.2 超促排卵与胚胎培养 根据患者的年龄、既往促排卵史、有无盆腔手术史、基础 FSH 值等,选择不同的促排卵方案,本中心常规使用长方案和拮抗剂方案。月经周期第 7 天开始 B 超监测排卵,根据卵泡数量、大小及雌激素( $E_2$ )水平调整用药剂量。当 2 个以上卵泡直径 $\geq 16$  mm,当晚给予肌注人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 250  $\mu$ g, 36 h 后由 B 超引导经阴道取卵。取卵术后,卵母细胞在受精培养基 HTF(SAGE, 美国)中培养 3~4 h(HCG 后 39~41 h),常规体外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 加精或行卵胞质内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI), 次日(授精后 16~18 h)观察受精情况。将受精卵转移到卵裂培养基 CM(SAGE, 美国)中继续培养,每日观察胚胎发育情况,72 h 后行胚胎移植或者冷冻。胚胎分级参照英国 Bourn Hall Clinic 标准(世界上第一例试管婴儿诞生地)将胚胎分为 4 级: I 级,胚胎卵裂球均匀规则,胞质均质透明,具完整透明带,碎片 $\leq 5\%$ ; II 级,胚胎卵裂球不甚均匀规则、胞质折光性有轻微改变,有少量碎片( $< 30\%$ ),透明带完整; III 级,胚胎卵裂球碎片 $< 50\%$ ,其余卵裂球的情况应该类似于 II 级胚胎,透明带完整; IV 级,卵裂球碎片 $\geq 50\%$ ,其余卵裂球应具活细胞的特征。胞质折光性具有较大的改变,胞质变黑,颗粒不均匀。D3 细胞数 $\geq 6$ ,且胚胎级别为 I 级和 II 级的 2 PN (pronucleus)来源胚胎为优质胚胎。

1.3 胚胎玻璃化冷冻与复苏 取卵后第 3 天选择优质胚胎进行鲜胚移植,将剩余的可用胚胎按照胚胎级别由高到低分管冷冻。玻璃化冷冻操作: ES、VS 平衡至室温。用预先拉制好的巴斯德吸管把胚胎转入 ES 表面,让胚胎自然下沉,胚胎出现皱缩再恢复,当胚胎膨大到原来的 80%~90%时,将其转入 VS 液中。ES 液中大约放置 5 min。在 VS 液中(要在不同 3 个位置做吸放,尽量去除 ES 液)将胚胎装载在 Cryotop 最前端,迅速投入液氮(胚胎进入 VS 到放入液氮的操作必须在 1 min 内完成),在液氮中用镊子把 Cryotop 的套管盖套好。胚胎复苏操作:准备好解冻用的 4 种试剂 TS、DS、WS1、WS2。

TS需37℃预热,DS、WS1、WS2于室温平衡。预先把需解冻的胚胎从液氮罐中找出,放入装有液氮的保温盒里预备好。在液氮中将Cryotop套管用镊子打开,以最快速度将Cryotop插入TS中,可轻晃使胚胎落到TS中。TS液中约1min。而后转移到DS内3min。在WS1、WS2分别5min。本中心所有FET周期的胚胎在移植当日解冻。

1.4 FET周期内膜准备与黄体支持 自然周期:对于月经规律,排卵正常患者。月经周期第9天开始B超监测排卵,当内膜>7mm,排卵日转化内膜。当内膜>8mm,即当日HCG10000IU加转化内膜。自然周期黄体支持:黄体酮阴道缓释凝胶1支/d或地屈孕酮30mg/d,加用HCG2000IU q3d(从胚胎移植日起)。人工周期:对于月经不规律、排卵障碍、或者内膜发育不良的患者,D5起E<sub>2</sub>2~6mg/d,7~8d后B超监测内膜,调整剂量。当内膜>7mm,E<sub>2</sub>>150pg/mL,>12d转化内膜。人工周期黄体支持:E<sub>2</sub>维持原剂量,加用黄体酮阴道缓释凝胶1支/d,加地屈孕酮30mg/d。促排卵周期:对于采用上述两种方法内膜准备失败的患者,HMG1~2支/d,排卵监测、内膜转化同自然周期。促排周期黄体支持:黄体酮阴道缓释凝胶1支/d或地屈孕酮30mg/d。

1.5 LAH 使用ZILOS-tk(HAMILTON THORNE,美国)LAH系统,将解冻后待移植的胚胎置于倒置显微镜下,选取卵裂球与透明带的间隙较大的区域或碎片集中分布的区域,将1.48μm二极体发射激光靶圈调整对准要削薄的透明带边缘,一手轻微移动载物台控制激光位置,同时用脚踏控制激光发射(激光参数:能量100%,脉冲120μs),由透明带的边缘向内削薄透明带。削薄深度为透明带厚度的1/2~2/3,长度为透明带周长的1/4。每个胚胎AH时间控制在数秒内。AH后转入CM液中培养1~2h,待移植。

1.6 妊娠诊断 移植后2周,验尿或者查血HCG阳性,诊断为生化妊娠。移植后4周,B超下见孕囊及原始心管搏动,诊断为临床妊娠。

1.7 统计学处理 采用SPSS 17.0软件对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验;率的比较采用 $\chi^2$ 检验,检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 临床及实验室指标 孵化组解冻134个胚胎,存活130个(存活率97.7%),移植胚胎130个。未孵化组解冻152个胚胎,存活148个胚胎(存活率97.4%),其中有6个D3卵裂期胚胎,解冻后患者要求培养囊胚,并签署了知情同意书,D5~D6未形成囊胚而弃掉,实际移植胚胎数142个。孵化组与未孵化组患者年龄、不孕年限、原发/继发不孕类型、既往移植失败次数、内膜厚度、优胚率和平均移植胚胎数等指标的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ )。具体见表1。

表1 孵化组与未孵化组周期各项指标比较

指标	孵化组	未孵化组
周期数 <i>n</i>	61	63
年龄(岁), $\bar{x} \pm s$	32.2±3.6	31.5±3.1
不孕年限(年), $\bar{x} \pm s$	4.2±3.9	5.0±3.5
助孕指征 $\%(n/n)$		
女方因素	31.1(17/61)	33.3(21/63)
男方因素	18.0(11/61)	11.1(7/63)
混合因素	45.9(28/61)	49.2(31/63)
不明原因	8.2(5/61)	6.3(4/63)
原发不孕	57.4(35/61)	58.7(37/63)
继发不孕	42.6(26/61)	41.3(26/63)
冻胚移植治疗方案 $\%(n/n)$		
激素替代周期	49.2(30/61)	55.6(35/63)
促排卵周期	24.6(15/61)	28.6(18/63)
自然周期	26.2(16/61)	15.9(10/63)
既往移植失败次数(次), $\bar{x} \pm s$	2.9±0.7	2.7±0.6
内膜厚度 <i>d</i> /mm, $\bar{x} \pm s$	9.6±1.5	10.2±1.5
解冻胚胎总数 <i>n</i>	134	152
胚胎存活率 $\%(n/n)$	97.7(130/134)	97.4(148/152)
优胚率 $\%(n/n)$	90.7(118/130)	89.1(132/148)
移植胚胎总数 <i>n</i>	130	142
移植胚胎数 $\bar{x} \pm s$	2.1±0.5	2.2±0.5

2.2 孵化组与未孵化组临床结局比较 由表2可见,孵化组的临床妊娠率、胚胎种植率均高于未孵化组( $P<0.05$ ),而流产率及新生儿出生时体质量虽也高于未孵化组,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。孵化组的早产率低于未孵化组,但两组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。



表2 孵化组与未孵化组临床结局比较

指标	孵化组	未孵化组
临床妊娠率 % (n/n)	47.5 (29/61)*	30.2 (19/63)
胚胎种植率 % (n/n)	29.2 (38/130)*	19.0 (27/142)
活产率 % (n/n)	82.8 (24/29)	84.3 (16/19)
流产率 % (n/n)	17.2 (5/29)	15.7 (3/19)
早产率 % (n/n)	16.7 (4/24)	31.2 (5/16)
多胎率 % (n/n)	33.3 (8/24)	37.5 (6/16)
新生儿体质量 m/kg, $\bar{x} \pm s$	3.1 $\pm$ 0.6	2.9 $\pm$ 0.7
出生缺陷率 % (n/n)	4.1 (1/24)	0.0 (0/16)

\*  $P < 0.05$  与未孵化组比较

### 3 讨论

透明带是一种糖蛋白,是卵母细胞重要的组成部分,它环绕在卵子周围,每次只允许一个精子穿过,防止了多精受精的发生。当受精卵由输卵管到达子宫时,透明带还可防止微生物和免疫细胞对胚胎的侵害<sup>[4]</sup>。胚胎发育到囊胚期后,将从透明带孵出,在子宫内膜上着床后开始整个发育过程。如果囊胚孵出失败,将会导致种植失败。因此,胚胎从透明带孵出是胚胎种植极其重要的一步。AH技术是采用人为手段削薄透明带厚度或者透明带打孔以帮助胚胎从透明带中孵出的技术。AH技术提高种植率的可能机制有:(1)胚胎培养和冷冻保存过程中,受到各种理化因素的影响,透明带糖基质改变导致透明带硬化或者由于女性FSH升高而致透明带增厚,影响囊胚孵出,AH技术有助于胚胎从透明带孵出<sup>[9-10]</sup>;(2)IVF患者卵巢受到外源促性腺激素刺激,种植窗比自然周期提前1~2 d<sup>[11]</sup>,而AH技术则帮助胚胎孵出,达到与子宫内膜发育同步的目的;(3)胚胎的AH技术促进胚胎与子宫内膜细胞之间的信息交换<sup>[12]</sup>。

AH技术应用于辅助生殖已20多年。AH有不同的操作方式,常用的有LAH、化学酸化、机械法和酶消化法等。Balaban等<sup>[13]</sup>研究表明,同一患者胚胎采用不同AH方法其临床结局并没有显著性差异。Hsieh等<sup>[14]</sup>认为,对于38岁以上不孕患者,LAH优于透明带酸化法。Hiraoka等<sup>[15]</sup>报道削薄透明带的1/2比削薄1/4更有利于胚胎孵化。Blake等<sup>[16]</sup>认为,削薄透明带长度的1/4是改善IVF-ET的临床妊娠率和胚胎种植率较适宜的削薄范围。近年来,LAH因其具有快速、安全、精准以及可减少胚胎体外操作时间等优点,成为一种主流方法,被大多数生殖中心所采用。然而,胚胎透明带上

打孔或削薄部位的卵裂球局部受热是LAH可能存在的一个问题,这与激光发射功率、脉冲的持续时间、脉冲大小、激光强度等参数有关。因此,根据透明带的厚度及时调节脉冲大小,可最大化避免对卵裂球造成的损伤。Tinney等<sup>[17]</sup>对小鼠胚胎模型激光的最佳脉冲进行了研究,发现1.48  $\mu\text{m}$ 二极体发射激光更有利于提高胚胎孵化率。本研究所采用的ZILOS-tk激光破膜系统,削薄透明带,能够发射强烈、精准的激光以最大化减少局部热效应,削薄厚度为透明带的为1/2~2/3,长度为透明带周长的1/4。

2003年起,AH子代的健康问题开始备受关注。AH对活产率和畸形率的影响并没有一致的结论。2004年Primi等<sup>[18]</sup>对62个LAH后出生的婴儿进行追踪,发现LAH对胎儿畸形率并无影响。Kanyó等<sup>[19]</sup>分析了134例婴儿,发现LAH并没有增加胎儿的畸形和染色体异常的比率。另有研究认为AH技术存在单卵多胎等妊娠风险<sup>[20]</sup>。已有有关AH后代五胞胎妊娠的报道<sup>[21]</sup>。Lanzendorf等<sup>[22]</sup>的研究结果显示,AH后代单卵多胎的发生率高达2.9%。多胎妊娠尤其是单卵多胎会增加婴儿的死亡率和发病率,围产儿死亡率是单卵多胎婴儿死亡率的2到3倍<sup>[20]</sup>。导致单卵多胎率增加的原因尚不明确,AH技术是否是影响多胎的因素之一尚无定论。

本研究结果显示,LAH组的临床妊娠率和胚胎种植率(47.5%、29.2%)均高于未孵化组(30.2%、19.0%),差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明对于种植失败的患者,FET周期中行LAH可提高FET周期的临床结局。本研究中所有临床妊娠孕妇全部分娩。孵化组的活产率(82.8%)、多胎率(33.3%)、早产率(16.7%)均低于未孵化组(84.3%、37.5%、31.2%),新生儿体质量(3.1  $\pm$  0.6)高于未孵化组(2.9  $\pm$  0.7),但两组间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。新生儿中,孵化组有1例新生儿耳朵畸形,未孵化组无一例新生儿畸形等出生缺陷。表明LAH技术并未影响活产率、多胎率、早产率和新生儿出生缺陷率。本研究将长期对这些患儿进行持续追踪随访。

综上所述,LAH可明显提高种植失败患者FET周期的临床妊娠率和胚胎种植率,改善其临床结局。但由于本研究样本有限,AH是否会导致单卵多胎,是否会增加流产率和畸形率,需要更多大样本不断深入的研究。

### [参考文献]

[1] Gunby J, Bissonnette F, Librach C, Cowan L; IVF

- Directors Group of the Canadian Fertility and Andrology Society. Assisted reproductive technologies (ART) in Canada: 2006 results from the Canadian ART Register[J]. *Fertil Steril*, 2010,93:2189-2201.
- [2] Amro E, Mohamed E M, Sherif H, Ghada M M, Ahmed E K. Effect of laser assisted hatching on outcome of assisted reproductive technology [J]. *OJOG*, 2013,3:18-23.
- [3] Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer M P, et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation[J]. *Hum Reprod*, 1990,5:7-13.
- [4] Chao K H, Chen S U, Chen H F, Wu M Y, Yang Y S, Ho H N. Assisted hatching increases the implantation and pregnancy rate of in vitro fertilization (IVF)-embryo transfer (ET), but not that of IVF-tubal ET in patients with repeated IVF failures[J]. *Fertil Steril*, 1997,67:904-908.
- [5] Sallam H N, Sadek S S, Agameya A F. Assisted hatching—a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2003,20:332-342.
- [6] Ali J, Rahbar S, Burjaq H, Sultan A M, Al Flamerzi M, Shahata M A. Routine laser assisted hatching results in significantly increased clinical pregnancies[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2003,20:177-181.
- [7] Martins W P, Rocha I A, Ferriani R A, Nastri C O. Assisted hatching of human embryos: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Hum Reprod Update*, 2011,17:438-453.
- [8] Nadir Ciray H, Bener F, Karagenc L, Ulug U, Bahçeci M. Impact of assisted hatching on ART outcome in women with endometriosis [J]. *Hum Reprod*, 2005,20:2546-2549.
- [9] Carroll J Depypere H, Matthews C D. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes[J]. *J Reprod Fertil*, 1990,90:547-553.
- [10] De Vos A, Van Steirteghem A. Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction[J]. *Cells Tissues Organs*, 2000,166:220-227.
- [11] Nikas G, Develioglou O H, Toner J P, Jones H W Jr. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles[J]. *Hum Reprod*, 1999,14:787-792.
- [12] Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis[J]. *Hum Reprod*, 1992,7:685-691.
- [13] Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A. A comparison of four different techniques of assisted hatching[J]. *Hum Reprod*, 2002,17:1239-1243.
- [14] Hsieh Y Y, Huang C C, Cheng T C, Chang C C, Tsai H D, Lee M S. Laser-assisted hatching of embryos is better than the chemical method for enhancing the pregnancy rate in women with advanced age[J]. *Fertil Steril*, 2002,78:179-182.
- [15] Hiraoka K, Hiraoka K, Horiuchi T, Kusuda T, Okano S, Kinutani M, et al. Impact of the size of zona pellucida thinning area on vitrified-warmed cleavage-stage embryo transfers: a prospective, randomized study[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2009,26(9-10):515-521.
- [16] Blake D A, Forsberg A S, Johansson B R, Wikland M. Laser zona pellucida thinning—an alternative approach to assisted hatching[J]. *Hum Reprod*, 2001,16:1959-1964.
- [17] Tinney G M, Windt M L, Kruger T F, Lombard C J. Use of a zona laser treatment system in assisted hatching: optimal laser utilization parameters[J]. *Fertil Steril*, 2005,84:1737-1741.
- [18] Primi M P, Senn A, Montag M, Van der Ven H, Mandelbaum J, Veiga A, et al. A European multicentre prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with a diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient populations[J]. *Hum Reprod*, 2004,19:2325-2333.
- [19] Kanyó K, Konc J. A follow-up study of children born after diode laser assisted hatching [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003,110:176-180.
- [20] Schieve L A, Meikle S F, Peterson H B, Jeng G, Burnett N M, Wilcox L S. Does assisted hatching pose a risk for monozygotic twinning in pregnancies conceived through *in vitro* fertilization [J]. *Fertil Steril*, 2000,74:288-294.
- [21] Pantos K, Kokkali G, Petroutsou K, Lekka K, Malligiannis P, Koratzis A. Monochorionic triplet and monoamniotic twins gestation after intracytoplasmic sperm injection and laser-assisted hatching [J]. *Fetal Diagn Ther*, 2009,25:144-147.
- [22] Lanzendorf S E, Ratts V S, Moley K H, Goldstein J S, Dahan M H, Odem R R. A randomized, prospective study comparing laser-assisted hatching and assisted hatching using acidified medium[J]. *Fertil Steril*, 2007,87:1450-1457.