



# Kontrollü Ovarian Hiperstimülasyon / İntrastoplazmik Sperm İnjesiyonu Yapılan Hastalarda 2 ve 3. Gün Embriyo Transferlerinin Gebelik Oranlarına Etkisi

## Effect of Embryo Transfer on Days 2 and 3 on Pregnancy Rates in Patients Undergoing Controlled Ovarian Hyperstimulation / Intracytoplasmic Sperm Injection

Serdar Çelik<sup>1</sup>, Birgül Gürbüz<sup>2</sup>, Dilek Cengiz Çelik<sup>2</sup>, Sevim Purisa<sup>3</sup>

### Özet / Abstract

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı kontrollü ovarian hiperstimülasyon (KOH)+ İntrasitoplazmik sperm injesiyonu (İCSI) uygulanan hastalarda 2 ve 3. gün embriyo transferinin (ET) gebelik oranlarına etkisinin araştırılması.

**Yöntemler:** Kliniğimize Şubat 2006 ile Mayıs 2010 tarihleri arasında erkek faktörü nedeniyle başvuran ve antagonist protokol ile İCSI uygulanan hastalar çalışmaya alındı. İkinci ve 3. gün ET yapılan hasta gruplarının gebelik oranları karşılaştırıldı.

**Bulgular:** İkinci ve 3. gün transfer yapılan hasta gruplarında embriyo kaliteleri benzerdi ( $p=0,828$ ). İkinci gün transfer yapılan grupta gebelik oranları daha yüksek olmasına rağmen istatistiki olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p=0,18$ ). Gebe kalmaya etki eden faktörler azoospermi ( $p=0,02$ ) ve toplanan oosit sayısı ( $p=0,001$ ) olarak bulundu.

**Sonuç:** Embriyoların kültürde 3 gün bekletilmesinin gebelik sonuçları üzerine olumsuz bir etkisi yoktur. ET kliniğin çalışma programına ve hastanın durumuna göre 2. veya 3. gün yapılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Embriyo transferi, gebelik oranı, kontrollü ovarian hiperstimülasyon

**Objective:** The aim of this study is to investigate the effect of embryo transfer of days 2 and 3 on pregnancy rates in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation/ intracytoplasmic sperm injection.

**Methods:** Individuals admitted to our clinic due to of male factor infertility between February 2006 and May 2010 and who underwent ICSI with the antagonist protocol were included in this study. Pregnancy rates between days 2 and 3 after embryo transfer were compared.

**Results:** Embryo qualities were similar between groups ( $p=0,828$ ). Although pregnancy rates tended to be higher in the 2-day transfer group, it was not statistically significant ( $p=0,18$ ). Azoospermia and the number of retrieved oocytes were predictive factors for a favorable outcome ( $p=0,001$ ).

**Conclusion:** Retaining the embryos in culture for 3 days had no negative influence on pregnancy outcomes. Embryo transfer may be performed either on day 2 or 3 according to the work program of the clinic.

**Keywords:** Embryo transfer, pregnancy rate, controlled ovarian hyperstimulation

### Giriş

İnfertilite tedavisi için etkin bir yöntem olan in vitro fertilizasyonun (IVF) pek çok adımı, bu tekniğin kullanıma girmesinden bu yana standartlaştırılmıştır. Ancak embriyo transferinin (ET) optimum zamanı hala tartışmalıdır.

IVF'in ilk dönemlerinde, Edwards ve ark. (1) ET'ni, oosit toplama işleminden (OPU) 3 veya 4 gün sonra 8-16 hücre aşamasında yaptılar (1). Daha sonra dünyanın birçok merkezinde ET 2. günde, 4 hücreli evrede uygulandı (2). Geçtiğimiz on yıl boyunca, bazı kliniklerde embriyo kültürünü 5-6 güne uzatmak rutin IVF prosedürlerinin bir parçası haline gelmiştir (3).

ET genelde oosit toplanmasından 2 veya 6 gün sonra yapılır (4). İkinci gün transfer edilen embriyolar, 4-8 hücre aşamasında embriyonik genom aktivasyonunu tamamlamış olanlardan seçilir (5). Embriyo kalite ölçümü, embriyo genomunun normal olduğunu göstermez. Transfer edilebilecek üçten fazla embriyo olduğunda embriyo seçimi zorlaşır. Uzman kültür periyodu embriyonik genom aktivasyonu (blastokist aşaması) için embriyo gelişimine olanak sağlar. Bu da transfer için uygun embriyoların seçimine yardımcı olur ve gebelik sonuçları üzerine olumlu olarak etki eder (6, 7).

Üçüncü gün embriyo transferlerinde gelişimi durmuş olan embriyolar ayıklanabilir ve transfer için daha uygun olanlar seçilebilir (8). Ancak kültür ortamında daha uzun süre kalması embriyo kaybına neden olabilir. İkinci gün ET ile gebelik elde edilememiş hastalarda 3.gün embriyo transferi yararlı olabilir (9).

Bu çalışmanın amacı; 2. ve 3. gün ET'leri arasındaki gebelik sonuçlarını karşılaştırmaktır.

### Yöntemler

Şubat 2006 ile Mayıs 2010 yılları arasında kliniğimizde yapılan intrastoplazmik sperm enjesiyonu/embriyo transferi (İCSI/ET) siklusları retrospektif olarak tarandı. Sadece etiyolojisi erkek faktörü olan ve kadın yaşının 40'tan küçük olduğu olgular çalışmaya dahil edildi. Uterin patoloji ve oto-

<sup>1</sup>VKV Amerikan Hastanesi, Tüp Bebek Kliniği, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Hisar Intercontinental Hastanesi, Tüp Bebek Kliniği, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Bilişim Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Bu araştırma, 4. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur, 07-10 Ekim 2010, Antalya, Türkiye.

#### Yazışma Adresi

#### Address for Correspondence:

Serdar Çelik, VKV Amerikan Hastanesi, Tüp Bebek Kliniği, İstanbul, Türkiye  
Tel.: +90 505 527 15 24  
E-posta: drserdarcelik@gmail.com

Geliş Tarihi/Received:  
02.05.2013

Kabul Tarihi/Accepted:  
25.11.2014

© Copyright 2015 by Available online at  
www.istanbulmedicaljournal.org

© Telif Hakkı 2015 Makale metnine  
www.istanbultipdergisi.org web sayfasından  
ulaşılabilir.

immun hastalığı olanlar ile kısa, uzun, mikrodaz agonist protokolü ile tedavi edilen olgular çalışma dışı bırakıldı. Sadece antagonist protokolü uygulanan hastalar çalışmaya dahil edildi. Doksan sekiz hasta bu kriterlere uygun bulunarak çalışmaya dahil edildi. İkinci ve 3. gün ET yapılan sikluslar karşılaştırıldı. Verilerin ait olduğu dönemde, çalışmanın yürütüldüğü klinikte 5. gün ET yapılmadığı için blastokist transferleri çalışmaya dahil edilmedi. OPU sonrası düşük fertilizasyon görülen hastalar ve ET için embriyo seçiminin 2. günde yapılabildiği vakalara 2. gün ET yapılmıştır.

İkinci ve 3. gün embriyo transferlerinde grade 1, grade 2 ve grade 3 embriyo seçimi yapılmış sikluslar (10), ikinci gün transferi yapılan grupta 2-6 hücreli, 3. gün transferi yapılan grupta 6-10 hücreli ET yapılan sikluslar çalışmaya dahil edildi. ET'yi takiben 12-14 gün sonra serum  $\beta$  human chorionic gonadotrophin ( $\beta$ HCG) ölçümleri yapılan ve pozitif çıkan hastalar 2 hafta sonra ultrasonografik muayeneye çağrıldı. Ultrasonografide gestasyonel kese ve fetal kalp atımı tespit edilen hastalar çalışmaya dahil edildi.

#### İstatistiksel analiz

Normallik denetimi Shapiro Wilk testi ve histogram grafikleri çizilerek yapıldı. Veriler ortalama, standart sapma, medyan, çeyrekler arası dağılım aralığı (IQR), frekans ve yüzde şeklinde sunuldu. İkili kıyaslamalar bağımsız gruplarda t testi, Mann Whitney U testi (normal dağılımayan değişkenler için), ki-kare ve Fisher kesin olasılık (Fisher's exact test) testi ile yapıldı. Analizler SPSS 17.0 programda yapıldı. Anlamlılık sınırı  $p < 0,05$  olarak alındı. Gebeliği etkileyen risk faktörlerini belirlemek için lojistik regresyon analizi yapıldı (SPSS 17.0 Chicago, USA).

#### Ovarian Stimulasyon ve Oosit Toplama

Antagonist protokolünde, gonadotropinlerle over stimulasyonu devam ederken dominant folikül boyutu  $>11-14$  mm olarak saptandığında gonadotrophin releasing hormone (GnRH) antagonisti (Orgalutran flakon 0 Organon, İstanbul, Türkiye)  $1 \times 1$  subkutan başlandı. GnRH antagonisti human chorionic gonadotrophin (hCG), (Pregnyl, Merck Sharp&Dohme, İstanbul, Türkiye) enjeksiyon günü dahil olacak şekilde siklus sonuna kadar sürdürüldü. En az 3 follikül çapı 18 mm ve üstüne ulaştığında  $10.000$  IU hCG intramuskuler verildi. HCG enjeksiyonundan 36 saat sonra OPU işlemi yapıldı.

#### Oosit ve Embriyo Kültürü

Ovoil (Vitrolife Sweden AB, Göteborg, İsveç) ile kaplanmış HSA (Human Serum Albumin, Vitrolife, Göteborg, İsveç) eklenmiş olan G-MOPS (Vitrolife, Göteborg, İsveç) mediumu içine toplanan oositler OPU işlemi bitiminde HSA eklenmiş G-IVF (Vitrolife, Göteborg, İsveç) mediumu içine alınarak  $37^\circ\text{C}$  ve  $\%6$   $\text{CO}_2$  ayarlı inkübatörlerle kaldırıldı. OPU'dan 2 saat sonra  $80$  IU/mL hyaluronidaz içeren G-MOPS mediumunda granüloza hücrelerinden temizlendi, G-MOPS mediumu içinde yıkandı ve tekrar G-IVF mediumu içine alınarak inkübatöre kaldırıldı. OPU'dan 4 saat sonra olgun olan oositlere ICSI işlemi uygulanarak Ovoil ile kaplanmış, HSA eklenmiş G-1 (Vitrolife, Göteborg, İsveç) medium dropletlerine alınarak  $37^\circ\text{C}$  ve  $\%6$   $\text{CO}_2$ 'li inkübatörler içine yerleştirildi. ICSI'den 18 saat sonra inverted mikroskop (Olympus IX71) altında döllenme kontrolü yapıldı. Döllenme kontrolü esnasında zigot içerisinde 2 adet pronukleus (PN) varlığı dikkate alındı. İkinci gün embriyo kontrolü döllenme kontrolünden 24 saat sonra, 3. gün embriyo kontrolü ise 48 saat sonra yapıldı. Döllenme kontrolünden önce ve 2. gün embriyo kontrolü öncesinde embriyolar yeni G-1 medium dropletlerine 3. gün embriyo kontrolü öncesinde de G-2 (Vitrolife, Göteborg, Sweden) medium dropletlerine alınarak değerlendirme yapıldı (11).

En iyi morfolojide ve evresine uygun gelişimde olan embriyolar seçilerek transfer yapıldı. Hastanın klinik bulgularına göre bir ile üç ET yapıldı.

#### Embriyo Morfolojisi

Transfer günü sabahı embriyolar hücre sayısı ve blastomerlerin simetrisi ile fragmentasyon yüzdesine göre sınıflandırıldılar. Birinci kalite (çok iyi kaliteli) embriyolar eşit büyüklükte blastomer içeren ve fragmentasyon görülmeyen embriyolardı. İkinci kalite (iyi kalite) embriyolar  $\%1-20$  fragmentasyon görülen ve/veya eşit olmayan büyüklükte blastomer görülen embriyolardı. Üçüncü kalite (orta kalite) embriyolar ise  $\%21-50$  fragmentasyon görülen ve eşit olmayan blastomerler içeren embriyolardı (10).

#### Bulgular

Toplam 98 hasta (ikinci günde ET yapılan 48, üçüncü günde ET yapılan 50 hasta) çalışmaya dahil edildi. Ölçümsel değişkenler için normallik testi, Shapiro-Wilks testi, leaf and steam ve histogram grafikleri çizilerek yapıldı. Normal dağılım gösteren değişkenlerin karşılaştırılması (yaş, oosit sayısı vb.) bağımsız gruplarda t test ile karşılaştırıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenler (infertilite süresi, transfer sayısı) Mann-Whitney testi ile karşılaştırıldı. Kategorik değişkenler chi-square ve fisher kesin olasılık testi ile değerlendirildi. Gebelik sonucuna etki eden faktörlerin belirlenmesi için lojistik regresyon analizi yapıldı. Hastaların klinik karakteristikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

İki grubun toplanan oosit sayıları, yaş ortalamaları, infertilite süresi, transfer edilen embriyo sayısı ve kullanılan ilaç dozu karşılaştırıldı. İkinci ve 3. gün transfer yapılan hasta grupları arasında transfer edilen embriyo sayısı, yaşları, toplanan oosit sayıları ve embriyo kaliteleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı. Ancak infertilite süresinin 3. gün ET yapılan grupta daha uzun olduğu saptandı ( $p=0,029$ ). İkinci ve 3. gün ET ve gebelik oranları karşılaştırıldığında 2. gün transferinde gebelik oranları daha yüksek saptansa da istatistiki olarak anlamlılık saptanmadı ( $p=0,108$ ). İki grup arasında transfer edilen embriyo kaliteleri açısından fark saptanmadı (Tablo 2).

Male faktörü olan vakalarda subgrup olarak azoospermi değerlendirildi. İki grup arasında dağılım açısından istatistiki fark saptanmadı ( $p=0,374$ ) (Tablo 3).

Hasta yaşı, infertilite süresi, embriyo kalitesi, transfer edilen embriyo sayısı gibi faktörlerin gebe kalmaya etki etmediği görüldü. p değerleri sırası ile  $p=0,319$ ,  $p=0,96$ ,  $p=0,83$ ,  $p=0,14$  olarak bulundu.

Oosit sayısı ( $p=0,001$ ) ve azoospermi gebe kalmaya etki eden faktörler olarak saptandı ( $p=0,04$ ). (Tablo 4) Ancak iki gruptaki azoospermi dağılım oranları arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,374$ ).

#### Tartışma

Biz bu çalışmaya etyolojide erkek faktörü olan ve antagonist protokol kullanılan 98 hastayı dahil ettik. Opuyı takiben 2. ve 3. gün ET'lerin gebelik oranlarına etkisini araştırdık.

**Tablo 1. İkinci gün ve 3. gün embriyo transfer hastalarının klinik özelliklerinin karşılaştırılması**

| Transfer günü                  | 2. gün ET     | 3. gün ET     | p değeri |
|--------------------------------|---------------|---------------|----------|
| İnfertilite süresi             | 4 (1-21)      | 6 (2-21)      | 0,029*   |
| Toplanan oosit sayısı          | 8 (1-16)      | 10 (0-20)     | 0,21     |
| Transfer edilen embriyo sayısı | 3 (2-3)       | 3 (2-3)       | 0,42     |
| Yaş                            | 30 (18-40)    | 30 (18-40)    | 0,055    |
| Kullanılan ilaç dozu           | 300 (150-475) | 300 (225-450) | 0,86     |
| Azoospermi                     | %8,3          | %14           | 0,37     |
| Klinik gebelik oranları        | %47,9         | %32           | 0,10     |

ET: embriyo transferi

\*: p&lt;0,05 İstatistiksel anlamlılık

**Tablo 2. Embriyo transfer günleri ve embriyo kalitelerinin dağılımı**

| Embriyo kalitesi | 2. gün ET  | 3. gün ET | p değeri |
|------------------|------------|-----------|----------|
| Grade 1          | 33 (%68,8) | 27 (%54)  | 0,054    |
| Grade 2          | 13 (%27,1) | 23 (%46)  |          |
| Grade 3          | 2 (%4,2)   | 0         |          |

ET: embriyo transferi

**Tablo 3. Transfer günü ve endikasyonların dağılımı (p:0,374)**

|                       | Endikasyon |              |    | p değeri |
|-----------------------|------------|--------------|----|----------|
|                       | Azoospermi | Erkek faktör |    |          |
| Embriyo transfer günü | 2          | 4            | 44 | 0,374    |
|                       | 3          | 7            | 43 |          |
| Toplam sayı           |            | 11           | 87 |          |

**Tablo 4. Gebeliğe etki eden faktörlerin dağılımı**

|                       |               | Gebelik       |            | p değeri |
|-----------------------|---------------|---------------|------------|----------|
|                       |               | YOK           | VAR        |          |
| Embriyo transfer günü | 2             | 25 (%42,4)    | 23 (%59)   | 0,108    |
|                       | 3             | 34 (%57,4)    | 16 (%41)   |          |
| Embriyo kalitesi      | 1             | 35 (%59,3)    | 25 (%64,1) | 0,78     |
|                       | 2             | 23 (%39)      | 13 (%33,3) |          |
|                       | 3             | 1 (%1,7)      | 1 (%2,6)   |          |
| İnfertilite süresi    | 5 (1-21)      | 5 (1-15)      | 0,96       |          |
| Kullanılan ilaç dozu  | 300 (150-475) | 300 (225-450) | 0,90       |          |
| Toplanan oosit sayısı | 7 (0-20)      | 11 (1-18)     | 0,001*     |          |
| Yaş                   | 30±5,9        | 28±4,9        | 0,319      |          |
| Azoospermi            | 10 (%16,9)    | 1 (%2,6)      | 0,04*      |          |

\*: p&lt;0,05 İstatistiksel anlamlılık

Ashrafi ve ark. (9), Edwards ve ark. (12) ve Dawson ve ark. (8) 3. gün transferinde gebelik oranlarının daha yüksek bulmalarına rağmen istatistiki olarak anlamlı fark saptamadılar. Huisman ve ark. (13) 2, 3 ve 4. gün embriyo transferlerini incelediği geniş retrospektif çalışmada implantasyon ve gebelik sonuçlarını incelediler ve her üç grupta da benzer sonuçlar saptadılar. Diğer başka prospektif çalışmalarda da 2. gün ve 3. gün embriyo transferleri arasında gebelik oranlarında istatistiki olarak anlamlı fark saptamadılar (6, 14, 15).

Carrillo ve ark. (16) 2 ve 3. gün ET karşılaştırdılar ve gebelik oranlarını 3. gün transferinde anlamlı olarak yüksek saptadılar (%44'e karşın %26) ancak bu çalışmada sadece yüksek oosit sayısı elde edilen hastalar çalışmaya alınmıştı. Diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edildi (17, 18). Bizim çalışmamızda 2 ve 3. gün ET'i ve gebelik oranları karşılaştırıldığında 2. gün transferinde gebelik oranları daha yüksek saptansa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Üçüncü gün transferinde gebelik oranlarının daha az olmasının, bu hastaların infertilite sürelerinin daha uzun olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Ancak çalışmamızda infertilite süresinin gebeliğe etki etmediğini saptadık.

Embriyoların 3. günde uterusu transfer edilmesi 2 günlük embriyoya göre fizyolojik zamanlamaya daha yakındır. Bunun dışında Etsüresini uzatmak transfer için daha uygun embriyoyu seçmeye olanak verir (14).

Laverge ve ark. (14) 2. günde iyi kalitedeki embriyo sayısının 3. güne göre daha fazla sayıda olduğunu saptadılar. Ancak bu gebelik oranlarını etkilememişti. Biz kendi çalışmamızda çok iyi kalitedeki embriyo sayılarını sırası ile 2. günde 33 (%68,8) 3. günde 27 (%54) olarak saptadık ve her iki grupta da dağılım açısından istatistiki fark yoktu.

Embriyoları in vitro kültürlerde 24 saat daha bekletmek, kötü kalitedeki ve gelişimi duran embriyoların eliminasyonunu sağlayabilir (19).

Çalışmanın retrospektif olması, vaka sayısının az olması, çalışmanın yapıldığı tarihler arasında beşinci ve altıncı gün embriyo transferi yapılmaması makalenin zayıf noktalarıdır.

## Sonuç

İkinci ve 3. gün ET'deki gebelik oranları arasında fark saptanmamıştır. Bu bulgular, kliniğin ve hastanın uygun olduğu zamanda ET'yi planlamanın güvenli olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda 2. gün veya 3. gün ET yapılan hastalardaki gebelik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamasına rağmen, hasta sayısının azlığı, makalenin retrospektif olması, blastokist transfer günlerini içermemesi çalışmanın gücünü etkilemiştir. Bu konuda geniş örneklem olduğu randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Etik Kurul Onayı:** Çalışmanın retrospektif tasarımı nedeniyle etik komite onayı alınmamıştır.

**Hasta Onamı:** Çalışmanın retrospektif tasarımı nedeniyle hasta onamı alınmamıştır.

**Hakem değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir - B.G., S.Ç., D.C.Ç.; Tasarım - B.G., S.Ç., D.C.Ç.; Denetleme - B.G.; Kaynaklar - S.Ç., D.C.Ç.; Malzemeler - S.Ç., B.G., D.C.Ç.; Veri toplanması ve/veya işlemesi - S.Ç.; Analiz ve/veya yorum - B.G., S.Ç., D.C.Ç.,

S.P.; Literatür taraması - S.Ç., B.G., D.C.Ç.; Yazıyı yazan - S.Ç., B.G., D.C.Ç.; Eleştirel inceleme - B.G.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

**Ethics Committee Approval:** Ethics committee approval was not received due to the retrospective nature of this study.

**Informed Consent:** Written informed consent was not obtained from patients due to the retrospective nature of this study.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept - B.G., S.Ç., D.C.Ç.; Design - B.G., S.Ç., D.C.Ç.; Supervision - B.G.; Funding - S.Ç., D.C.Ç.; Materials - S.Ç., B.G., D.C.Ç.; Data Collection and/or Processing - S.Ç.; Analysis and/or Interpretation - B.G., S.Ç., D.C.Ç., S.P.; Literature Review - T.S.Ç., B.G., D.C.Ç.; Writer - S.Ç., B.G., D.C.Ç.; Critical Review - B.G.

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

## Kaynaklar

1. Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynecol* 1980; 87: 737-56. [\[CrossRef\]](#)
2. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley T, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocyst increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfer. *Fertil Steril* 1998; 69: 84-8. [\[CrossRef\]](#)
3. 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: 1680-3. [\[CrossRef\]](#)
4. 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. [\[CrossRef\]](#)
5. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four and eight cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332: 458-61. [\[CrossRef\]](#)
6. Ertzeid G, Dale PO, Tanbo T, Storeng R, Kjekshus E, Abyholm T. Clinical outcome of day 2 versus day 3 embryo transfer using serum-free culture media: A prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 529-34. [\[CrossRef\]](#)
7. Oatway C, Gunby J, Daya S. Day three versus day two embryo transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 2: CD004378.
8. Dawson KJ, Conaghan J, Ostera GR, Winston ML R, Hardy K. Delaying transfer to the third post-insemination, to select non-arrested embryos, increases development to the fetal heart stage. *Hum Reprod* 1995; 10: 177-82. [\[CrossRef\]](#)
9. Ashrafi M, Kiani K, Mirzaagha E, Shabani F. The Pregnancy Outcomes of Day 2 versus Day 3 Embryo Transfer: A Cross-Sectional Study. *Iranian Journal of Fertility and Sterility* 2007; 1(2): 47-54.
10. Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001; 16: 313-8. [\[CrossRef\]](#)
11. Urman B, Yakin K, Ata B, Isiklar A, Balaban B. Effect of hyaluronan-enriched transfer medium on implantation and pregnancy rates after day 3 and day 5 embryo transfers: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 2008; 90: 604-12. [\[CrossRef\]](#)
12. Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, Steptoe PC, Webster JM. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fertil. Embryo Transfer* 1984; 1: 3-23.
13. Huisman GJ, Alberda AT, Leerentveld RA, Verhoeff A, Zeilmaker GH. A comparison of in vitro fertilization results after embryo transfer after 2, 3, and 4 days of embryo culture. *Fertil Steril* 1994; 61: 970-1.
14. Laverge H, De Sutter P, Van der Elst J, Dhont M. A prospective, randomized study comparing day 2 and day 3 embryo transfer in human IVF. *Hum Reprod* 2001; 16: 476-80. [\[CrossRef\]](#)
15. Van Os HC, Alberda A Th, Janssens-Caspers H A B, Leerentveld RA, Scholtes MCW, Zeilmaker GH. The influence of the interval between in vitro fertilization and embryo transfer and some other variables on treatment outcome. *Fertil Steril* 1989; 51: 360-62.
16. Carillo AJ, Lane B, Pridham DD, et al. Improved clinical outcomes for in vitro fertilization with delay of embryo transfer from 48 to 72 hours after oocyte retrieval: use of glucose and phosphate-free media. *Fertil Steril* 1998; 69: 329-34. [\[CrossRef\]](#)
17. Quinn P, Stone BA, Marrs RP. Suboptimal laboratory conditions can affect pregnancy outcome after embryo transfer on day 1 or 2 after insemination in vitro. *Fertil Steril* 1990; 53: 168-70.
18. Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Martin-Pont B, Porcher R, Hugues JN, et al. Day 3 compared with day 2 cryopreservation does not affect embryo survival but improves the outcome of frozen-thawed embryo transfers. *Fertil Steril* 2006; 86: 1537-40. [\[CrossRef\]](#)
19. Aboulghar MM, Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Amin YM, Abou-Setta AM. Pregnancy rate is not improved by delaying embryo transfer from days 2 to 3. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 107: 176-9. [\[CrossRef\]](#)