

# HOẠT HÓA NOÃN BẰNG CALCIUM IONOPHORE SAU TIÊM TINH TRÙNG VÀO BÀO TƯƠNG NOÃN

Nguyễn Thị Thu Lan<sup>\*†</sup> Mai Công Minh Tâm<sup>\*</sup> Trương Thị Thanh Bình<sup>\*†</sup> Huỳnh Gia Bảo<sup>\*</sup>  
Hà Thanh Quế<sup>\*</sup> Phạm Thanh Xuân<sup>†</sup> Hồ Mạnh Tường<sup>\*†</sup>

## Tóm tắt

Mục tiêu: Nhằm đánh giá hiệu quả sử dụng phương pháp hoạt hóa noãn bằng calcium ionophore lên các chu kỳ điều trị thụ tinh trong ống nghiệm bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) do tinh trùng ít, yếu và dị dạng (OAT) nặng.

Thiết kế nghiên cứu: Thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có nhóm chứng.

Phương pháp: Noãn từ mỗi trường hợp điều trị ICSI được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm: Nhóm 1 được thực hiện hỗ trợ hoạt hóa noãn (AOA) bằng calcium ionophore 10  $\mu$ M sau khi ICSI và nhóm 2 là nhóm đối chứng (không thực hiện AOA sau ICSI). Tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ thoái hóa, tỷ lệ phân chia tạo phôi của noãn sau thụ tinh và tỷ lệ tạo phôi có chất lượng khá/tốt được so sánh giữa hai nhóm.

Kết quả: 1.588 noãn từ 101 chu kỳ điều trị ICSI do OAT nặng từ tháng 6/2010 đến tháng 7/2011 tại IVFAS (Bệnh viện An Sinh). Nhóm 1 (ICSI + AOA) có 802 noãn, nhóm 2 (ICSI) có 786 noãn. Có sự gia tăng đáng kể về tỷ lệ thụ tinh ở nhóm 1 so với nhóm 2 (80,8% so với 74,3%,  $P < 0,002$ ). Các tỷ lệ khác không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm.

Kết luận: Phương pháp AOA có thể là tăng tỷ lệ thụ tinh của phương pháp ICSI đối với các trường hợp OAT nặng.

## Abstract

### OOCYTE ACTIVATION WITH CALCIUM IONOPHORE AFTER INTRACYOPLASMIC SPERM INJECTION

Objective: To evaluate the efficiency of artificial oocyte activation (AOA) with calcium ionophore on intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles with severe oligo-terato-asthenozoospermia (OAT).

Design: Randomized control trial (RCT)

Methods: Oocytes of each ICSI treatment cycle were randomly assigned to apply either AOA with calcium ionophore 10 $\mu$ M after ICSI (group 1) or ICSI without AOA (group 2) as controls. The rates of fertilization, degeneration, cleaving and good embryo were compared between two groups.

Results: 1,588 oocytes from 101 cycles with severe OAT were treated with ICSI between June 2010 and July 2011 at IVFAS (An Sinh Hospital). Numbers of oocytes assigned into group 1 (ICSI + AOA) and group 2 (ICSI) were 802 and 786, respectively. There is a significant increase in the fertilization rate in group 1 compared with group 2 (80.8% vs 74.3%,  $P < 0.002$ ). The other rates were not significantly different between two groups.

Conclusion: AOA can improve fertilization rate in ICSI treatment with severe OAT.

## Giới thiệu

Hiện nay, ở phần lớn các nước phát triển và đang

phát triển, 5 – 7% các cặp vợ chồng phải tìm đến sự giúp đỡ từ các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản.<sup>(1)</sup> Trong đó, kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) cổ điển được xem là kỹ thuật đem lại hiệu quả thành công cao nhất đối với các cặp vợ chồng hiếm muộn – vô sinh. Tuy nhiên, kỹ thuật này cũng trở nên bất lực trước nhiều trường hợp, đặc biệt là những trường hợp vô sinh do tinh trùng yếu nặng. Ở những bệnh nhân này, tinh trùng không có khả năng xuyên qua màng trong suốt của noãn, do đó, kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI – intracytoplasmic sperm injection) được áp dụng để giải quyết vấn đề này. Với kỹ thuật ICSI, tinh trùng được chọn lọc và tiêm trực tiếp vào tế bào chất của noãn. Mặc dù tỷ lệ thụ tinh của noãn sau ICSI xấp xỉ 70%, nhưng có khoảng 2 – 3% số chu kỳ ICSI có noãn hoàn toàn không thụ tinh sau khi tiêm tinh trùng.<sup>(2)</sup> Đối với những noãn bình thường, sau khi có sự xâm nhập của tinh trùng, noãn có khả năng hoạt hóa thông qua hiện tượng phóng thích ion calci ( $Ca^{2+}$ ) từ lưới nội chất, làm gia tăng nồng độ  $Ca^{2+}$  nội bào nhờ sự xúc tác của một phospholipase C đặc hiệu của tinh trùng (được gọi là PLC $\zeta$ ) nằm trên màng nhân của tinh trùng.<sup>(3)</sup> Kết quả là hiện tượng thụ tinh giữa noãn và tinh trùng xảy ra. Nhiều nghiên cứu trên thế giới cho thấy, hơn 80% số noãn không thụ tinh bị dừng chu trình phát triển tại giai đoạn kỳ trung gian của giảm phân II (MII – metaphase II) là do thất bại trong quá trình hoạt hóa noãn sau khi có sự xâm nhập của tinh trùng và nguyên nhân chính của hiện tượng này là do sự thiếu PLC  $\zeta$  từ tinh trùng.<sup>(4)</sup>

Đối với những trường hợp noãn không có hiện tượng thụ tinh sau khi tiêm tinh trùng do thất bại trong quá trình hoạt hóa noãn, người ta đã nghĩ đến cách khởi động quá trình này một cách nhân tạo. Nhiều phương pháp hoạt hóa noãn nhân tạo (AOA – artificial oocyte activation) khác nhau đã được áp dụng tại nhiều trung tâm TTTON trên thế giới. Hai phương pháp AOA được biết đến nhiều nhất hiện nay là AOA bằng dòng điện và AOA hóa học. Với phương pháp AOA bằng dòng điện, một dòng điện rất nhỏ được sử dụng để kích thích noãn sau ICSI, điện trường sẽ tạo thành những lỗ nhỏ trên màng

\*IVFAS, Bệnh viện An Sinh, TpHCM

†Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe sinh sản, Khoa Y, Đại học Quốc gia Tp.HCM

bào tương noãn và nhờ đó sẽ kích thích tạo dòng  $Ca^{2+}$  bên trong noãn. Phương pháp này từng được áp dụng thành công trên noãn bò và noãn người.<sup>(5)</sup> Với phương pháp AOA hóa học, những hợp chất hóa học (như calcium ionophore A213187, ionomycin, purimycin, strontium chloride,...) có thể được sử dụng để tạo ra sự gia tăng nồng độ  $Ca^{2+}$  và khởi động phản ứng hoạt hóa noãn. Những thành phần này sẽ xúc tiến sự giải phóng  $Ca^{2+}$  nội bào từ các nguồn dự trữ của tế bào cho đến khi cạn, điều này sẽ tạo thuận lợi cho  $Ca^{2+}$  ngoại bào tràn vào. Nhờ đó mà nồng độ  $Ca^{2+}$  bên trong tế bào tăng lên, và kết quả là hoạt hóa noãn xảy ra.

Trong TTON, một nhóm bệnh nhân đặc biệt thường phải đối mặt với tình trạng thất bại thụ tinh sau ICSI như tinh trùng ít, yếu và dị dạng (OAT – oligoasthenoteratozoospermia) nặng và tinh trùng đầu tròn (globozoospermia: tinh trùng có đầu tròn, ít hoặc không có acrosome). Những dạng tinh trùng này thường chứa rất ít PLC $\zeta$  so với những tinh trùng có hình dạng bình thường.<sup>(6)</sup> Do đó, người ta thường thực hiện AOA ở những trường hợp này nhằm tăng tỉ lệ thụ tinh sau ICSI. Hiện nay, ở một số trung tâm trên thế giới, AOA còn được mở rộng chỉ định đối với những trường hợp tinh trùng thu từ phẫu thuật (PESA – percutaneous epididymal sperm aspiration hay TESE – testicular sperm extraction).

Cho đến nay, đa số các nghiên cứu về áp dụng AOA trong kỹ thuật ICSI là các báo cáo ca, loạt ca hoặc không đối chứng. Một vài nghiên cứu là ngẫu nhiên có đối chứng, trong đó cho thấy AOA có thể có hiệu quả cải thiện kết quả ICSI đối với các trường hợp tinh trùng bất thường.<sup>(3,1)</sup>

Tại Việt Nam, kỹ thuật ICSI được áp dụng thành công từ năm 1998. Hiện nay, ICSI đã trở thành kỹ thuật thường qui và phổ biến tại tất cả các trung tâm TTON ở Việt Nam. Chúng tôi đã bắt đầu áp dụng AOA cho một số trường hợp tinh trùng bất thường hoàn toàn dạng đầu tròn và bất động toàn bộ cho kết quả điều trị khả quan. Cho đến nay chưa có báo cáo nào ở Việt Nam về việc đánh giá hiệu quả của AOA trong ICSI cho các trường hợp tinh trùng yếu nặng.

**Mục tiêu nghiên cứu:** Đánh giá hiệu quả của AOA trong kỹ thuật ICSI đối với các trường hợp tinh trùng yếu nặng.

**Phương pháp nghiên cứu**

Đây là đề tài nghiên cứu cấp Đại học Quốc gia TPHCM, do Trung tâm nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản thuộc Khoa Y chủ trì. Thu thập số liệu được thực hiện tại Đơn vị Hỗ trợ Sinh sản

(IVFAS), Bệnh viện An Sinh. Đề tài nghiên cứu được phê duyệt bởi Hội đồng khoa học Khoa Y, Đại học Quốc gia TPHCM.

Tất cả những trường hợp TTON tại IVFAS (Bệnh viện An Sinh) trong thời gian nghiên cứu thỏa các điều kiện nhận mẫu được nhận vào nghiên cứu cho đến khi đạt cỡ mẫu tối thiểu.

- Bệnh nhân dưới 38 tuổi
- Dự trữ buồng trứng bình thường (AFC  $\geq$  6)
- Nội tiết và độ dày nội mạc tử cung bình thường
- Được chỉ định TTON bằng kỹ thuật ICSI do

OAT nặng: <1 triệu tinh trùng bình thường/mẫu (theo tiêu chuẩn WHO 2010)

Noãn của từng trường hợp được chia ngẫu nhiên thành hai nhóm. Nhóm điều trị được áp dụng AOA sau khi thực hiện ICSI. Nhóm chứng chỉ được điều trị với ICSI thông thường. Sau đó cả hai nhóm được nuôi cấy và theo dõi như những chu kỳ TTON bình thường. (Xem sơ đồ nghiên cứu).

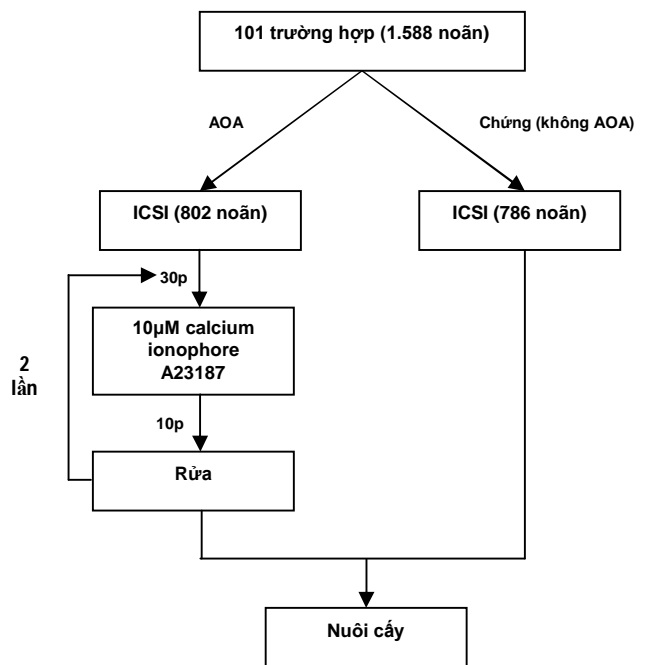
Bệnh nhân được giải thích và đồng ý tham gia nghiên cứu.

**Cỡ mẫu**

Cỡ mẫu được tính theo công thức kiểm định giả thuyết về 2 tỉ lệ trong quần thể với

- $P_1 = 0,75$
- $P_2 = 0,53$
- Độ tin cậy 90%
- Mức ý nghĩa 5%

Cỡ mẫu tối thiểu là  $n_1 = n_2 = 786$  (noãn)



Sơ đồ nghiên cứu

**Bảng 1: Tuổi trung bình và một số đặc điểm chính của 101 chu kỳ điều trị trong nghiên cứu**

Tuổi	31,5 ± 4,4
Số phôi chuyển	4,1 ± 0,5
NMTC vào ngày tiêm hCG (mm)	11,4 ± 1,3

**Bảng 2: So sánh các chỉ số nghiên cứu giữa hai nhóm noãn điều trị và nhóm chứng**

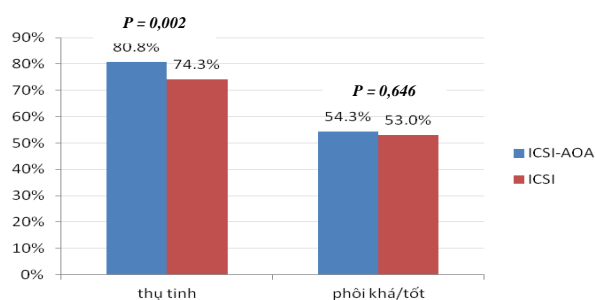
	ICSI-AOA	ICSI (đối chứng)	P
Số noãn	802	786	
Tỉ lệ thụ tinh	80,8% (648/802)	74,3% (584/786)	<0,002
Tỉ lệ thoái hóa	7,4% (59/802)	7,6% (60/786)	0,936
Tỉ lệ phân chia tạo phôi	96,8% (627/648)	98,9% (578/584)	0,328
Tỉ lệ phôi khá/tốt	54,3% (341/627)	53,0% (307/578)	0,646

**Bảng 3: Kết quả có thai của các trường hợp TTTON trong nghiên cứu**

	Tần suất	Tỉ lệ
βhCG	56/101	55,4%
Thai lâm sàng	47 <sup>†</sup> /101	46,5%
Tỉ lệ làm tổ	56/206 <sup>‡</sup>	27,2%

<sup>†</sup>3 trường hợp thai sinh hóa, 1 trường hợp túi thai trống, 5 trường hợp bệnh nhân không thử thai

<sup>‡</sup>chỉ tính trên những trường hợp bệnh nhân có thai lâm sàng và đến siêu âm thai tại IVFAS (trong đó có 34 trường hợp đơn thai, 9 trường hợp song thai và 4 trường hợp tam thai)



**Biểu đồ 1. Tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ phôi khá/tốt giữa 2 nhóm**

Các chỉ số đánh giá kết quả bao gồm: tỉ lệ thụ tinh noãn, tỉ lệ loại noãn thoái hóa sau ICSI, tỉ lệ noãn thụ tinh phát triển thành phôi, tỉ lệ phôi tốt.

### Kết quả

Từ tháng 6/2010 đến tháng 7/2011, có 101 trường hợp ICSI bất thường tinh trùng nặng được nhận vào nghiên cứu. Tổng số noãn thu được là 1588. Nhóm được thực hiện ICSI+AOA có 802 noãn và nhóm chứng thực hiện ICSI bình thường có 786 noãn.

Tất cả có 101 trường hợp được chuyển phôi. Đa số các trường hợp được chuyển phôi bao gồm cả hai loại phôi từ noãn có hoặc không có AOA.

### Bàn luận

Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam và là nghiên cứu với cỡ mẫu lớn so với những nghiên cứu tương tự trên thế giới. Kết quả nghiên cứu cho thấy trong các trường hợp điều trị ICSI với tinh trùng bất thường nặng, tỉ lệ thụ tinh ở noãn sau ICSI được xử lý AOA cao hơn so với noãn không được xử lý AOA, và sự khác biệt này giữa hai nhóm có ý nghĩa thống kê (P < 0,002).

Tỉ lệ thụ tinh thấp của noãn sau ICSI ở một số trường hợp xuất phát từ nguyên nhân tinh trùng mất một phần hay mất hoàn toàn khả năng hoạt hóa noãn do thiếu hoặc ít yếu tố giúp hoạt hóa noãn nằm ở phần vỏ nhân (PLCζ), gần vùng thể cực đầu (acrosome) của tinh trùng.<sup>(2)</sup> Thường những tinh trùng mang các bất thường ở vùng cực đầu hay có hình dạng bất thường sẽ có khả năng thụ tinh với noãn thấp hơn so với những tinh trùng có hình dạng bình thường.<sup>(7,8)</sup> Như đã trình bày ở phần giới thiệu, sự thất bại trong quá trình thụ tinh giữa tinh trùng với noãn phần lớn là do thiếu PLCζ ở tinh trùng khiến ít có khả năng kích hoạt dòng Ca<sup>2+</sup> nội bào. Do đó, việc bổ sung Ca<sup>2+</sup> tự do ngoại bào bằng calcium ionophore sau khi ICSI có thể tạo ra sự tích lũy Ca<sup>2+</sup> trong noãn và giúp noãn được kích hoạt.<sup>(9)</sup> Trong nghiên cứu này, những trường hợp tinh trùng dị dạng nặng được nhận chủ yếu là tinh trùng OAT nặng, tinh trùng phẫu thuật (PESA hay TESE) và tinh trùng phẫu thuật trữ lạnh. Tinh trùng ở những trường hợp này có nguy cơ giảm tỉ lệ thụ tinh hay không thụ tinh sau ICSI. Kết quả từ nghiên cứu này (bảng 2) cho thấy việc sử dụng AOA để xử lý noãn sau ICSI có hiệu quả làm tăng tỉ lệ thụ tinh và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (P < 0,002). Nghiên cứu mới nhất về việc sử dụng calcium ionophore của Takisawa và cộng sự (2011) trên 85 cặp vợ chồng đã từng thất bại trong điều trị TTTON, kết quả cho thấy tỉ lệ thụ tinh của noãn ở chu kỳ TTTON có sử dụng AOA cao hơn nhiều so với noãn ở chu kỳ TTTON trước (62,5% so với 20,9%, P < 0,01). Nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy AOA giúp cải thiện tỉ lệ thụ tinh.<sup>(9,10,11)</sup>

Trong nghiên cứu của Mohammad và cộng sự (2008), tỉ lệ thụ tinh giữa noãn ở nhóm AOA tăng đáng kể so với nhóm không AOA (66,79 ± 23,57 so với 52,73 ± 31,71; P = 0,001). Tỉ lệ phân chia tạo thành phôi sau 48 giờ ICSI giữa hai nhóm cũng không có sự khác biệt (95,73 ± 36,16 so với 88,45 ± 30,87; P = 0,15 > 0,05). Tuy nhiên, khi các tác giả quan sát khả năng phân chia tạo thành phôi sau 72 giờ ICSI (ngày 3) thì tỉ lệ này giữa hai nhóm lại có sự khác biệt có ý



ngĩa thống kê ( $74,77 \pm 36,22$  so với  $49,95 \pm 38,58$ ;  $P = 0,001$ ). Trong nghiên cứu này, do phác đồ điều trị TTTON hiện nay tại trung tâm của chúng tôi chỉ nuôi phôi đến ngày thứ 2 sau ICSI và sau đó tiến hành chuyển phôi cho bệnh nhân nên khả năng phân chia của phôi chỉ được quan sát và đánh giá vào ngày thứ 2; và kết quả phân tích cho thấy tỉ lệ phân chia tạo thành phôi (vào ngày 2 sau ICSI) giữa nhóm AOA và nhóm chứng trong nghiên cứu này không có sự khác biệt ( $P > 0,05$ ). Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu khác được công bố.<sup>(9-11)</sup>

Chúng tôi ghi nhận tỉ lệ phôi tốt ở nhóm nghiên cứu có xu hướng cao hơn chứng, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (54,3% so với 53%) ( $P > 0,05$ ). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Mohammad và cộng sự (2008), cụ thể là tỉ lệ phôi có chất lượng tốt đều như nhau giữa hai nhóm khi quan sát ở 48 giờ sau ICSI.

Mặc dù các trường hợp nhận vào nghiên cứu là những trường hợp tinh trùng có bất thường rất nặng, tỉ lệ thụ tinh noãn nói chung, tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ làm tổ của phôi của các trường hợp nghiên cứu của chúng tôi là khá cao (bảng 2, 3). Các tỉ lệ này là tương đương hoặc cao hơn các tỉ lệ chung tại chương trình TTTON của chúng tôi ở cùng một thời điểm. Kết quả này cho thấy kỹ thuật AOA có thể giúp cải thiện tỉ lệ thành công chung của chương trình. Mặc dù không được chứng minh qua thiết kế nghiên cứu này, AOA có thể góp phần cải thiện tỉ lệ làm tổ của phôi và tỉ lệ thai lâm sàng.

Những ảnh hưởng có thể có khi cho noãn tiếp xúc với những yếu tố hóa học như calcium ionophore lên sự phát triển của trẻ sau này chưa được xác định rõ, cho đến nay, chưa có một báo cáo nào cho thấy ảnh hưởng xấu của hóa chất này lên noãn và kết quả phân tích tỉ lệ noãn thoái hóa giữa 2 nhóm cho thấy calcium ionophore không gây ảnh hưởng bất lợi nào lên noãn sau khi cho noãn tiếp xúc với hợp chất này. Các báo cáo về kết quả sản khoa của số trẻ sinh ra sau khi áp dụng AOA cho đến nay cho không phát hiện bất thường.<sup>(12,13)</sup> Chúng tôi cũng không ghi nhận bất thường nào ở các trẻ sinh ra từ kỹ thuật ICSI có sử dụng AOA tại chương trình TTTON của chúng tôi.

### Kết luận

Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam về hoạt hóa noãn nhân tạo và với cỡ mẫu lớn so với những nghiên cứu tương tự trên thế giới. Kết quả cho thấy việc áp dụng phương pháp AOA bằng calcium

ionophore để hoạt hóa noãn sau ICSI ở những trường hợp tinh trùng OAT nặng giúp làm tăng đáng kể tỉ lệ thụ tinh. Chúng tôi không tìm thấy sự khác biệt về chất lượng phôi giữa nhóm nghiên cứu và nhóm chứng.

Chúng tôi cũng đã xây dựng thành công qui trình áp dụng AOA vào kỹ thuật ICSI tại Việt Nam và đạt được hiệu quả điều trị khá tốt. Qui trình này có thể được chuyển giao đến các trung tâm khác ở Việt Nam để áp dụng hỗ trợ điều trị cho các trường hợp bất thường tinh trùng nặng.

### Tài liệu tham khảo

1. Mohammad HN, Mohammad RD and Marziyeh T (2010). Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 94 (2): 520 – 526.
2. Mohammad HN, Shahnaz R, Zeinab J and Marziyeh T (2008). Artificial oocyte activation in severe teratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 90 (6): 2231 – 2337.
3. Young C, Grasa P, Cowerd, David LC, Parrington J (2008). Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and acrosome reaction. *Fertil Steril*. 91 (5), Supplement: 2230 – 2242.
4. Terasik J, Sousa M, Testart J (1994). Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. (9): 511 – 518.
5. Mansour R, Fahmy I, Tawad N, Kamal A, El-Demery J, Aboulghar M, et al (2009). Electrical activation of oocytes after intracytoplasmic sperm injection: a controlled randomized study. *Fertil Steril*, (91): 133 – 139.
6. Heytens E, Parrington J, Lambrecht S, Young C, Coward K, Cuvelier C, et al (2008). First evidence of distribute expression of the oocyte-activating factor PCLZ in globozoospermic men. *Hum Reprod* (23): i103.
7. Fenichel P, Donzeau M, Farahifar D, Basteris B, Ayraud N, His BL (1991). Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 55: 994 – 999.
8. Rybouchkin AV, Sutter PD, Straeten FV, Dhont M, Quatacker J (1997). Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-head sperm associated with deficient oocyte activation capacity. *Fertil Steril*, 68: 1144 – 1148.
9. Edson B, Daniela B, Tatiana B, Assumpto I and Jose F (2009). Artificial oocyte activation with calcium ionophore A23187 in intracytoplasmic sperm injection cycles using surgically retrieved spermatozoa. *Fertil Steril*, 92 (1): 131 – 136.
10. Nakagawa K, Yamano S, Moride N, Yamashita M, Yoshizawa M, Aono T (2001). Effect of activation with Ca ionophore A23187 and puromycin on the development of human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 76: 148 – 152.
11. Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Zylber-Haran E and Silber SJ (2003). Successful pregnancy a delivery after calcium ionophore oocytes activation in a normozoospermic patient with previous repeated failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 79: 138 – 140.
12. Takisawa T, Sato Y, Tasaka A, Ito Y, Nakamura Y and Hattori H (2011). Effect of oocyte activation by calcium ionophore A23187 or strontium chloride in patients with low fertilization rates and follow-up of babies. *Fertile and Steril*, 96 (3), Supplement.
13. Yukihiko T, Hisataka H, Aiko T, Tomohisa U, Nohuo Y and Kunihiro O (2008). Successful pregnancy after oocyte activation by a calcium ionophore for a patient with recurrent intracytoplasmic sperm injection failure, with an assessment of oocyte activation and sperm centrosomal function using bovine eggs. *Fertil Steril*, 91 (3): 935e11 – 935e14.