

# NHỮNG CẢI TIẾN MỚI TRONG PHƯƠNG PHÁP ICSI ĐỂ NÂNG CAO HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ THỤ TINH ỒNG NGHIỆM

KS. Trương Văn Hải<sup>1</sup>, CN. Nguyễn Quỳnh Như<sup>1</sup>, ThS. Huỳnh Trọng Kha<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bệnh viện Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột, <sup>2</sup>Bệnh viện đa khoa Mỹ Đức

## TỔNG QUAN

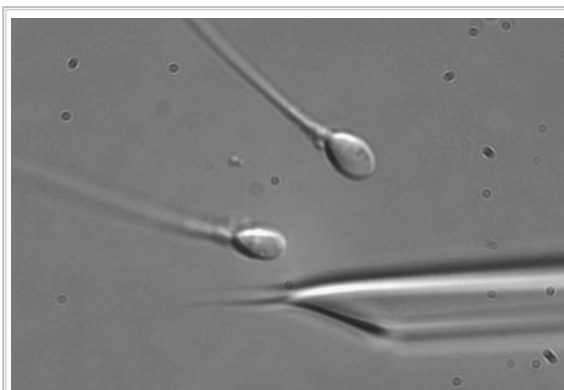
Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (Intra Cytoplasmic Sperm Injection – ICSI) được giới thiệu lần đầu tiên năm 1990 như một trong những bước đột phá trong công nghệ hỗ trợ sinh sản (Assisted Reproductive Technologies – ART). Từ đó đến nay, ICSI đã trở thành công nghệ sử dụng phổ biến, chiếm khoảng 70 – 80% các chu kỳ điều trị ART. Kỹ thuật ICSI quy ước (conventional-ICSI – c-ICSI) được thực hiện trên hệ thống kính hiển vi phản pha đảo ngược có tích hợp bộ vi thao tác và quan sát, chọn lựa tinh trùng, tiêm tinh trùng dựa trên hình thái 3D quan sát thấy trên kính.

Trong thực hành lâm sàng, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến kết quả thực hiện c-ICSI, trong đó chất lượng giao tử và kinh nghiệm của chuyên viên phôi học đóng vai trò quan trọng. Để cải thiện hiệu quả c-ICSI, nhằm gia tăng chất lượng điều trị ART, hiện nay nhiều phương pháp ICSI cải tiến đã được phát triển và ứng dụng trong các trung tâm IVF. Chất lượng noãn sẽ do bác sĩ lâm sàng phần lớn tác động cải thiện, vì vậy bài viết này nhằm cập nhật một số phương pháp cải tiến mới để gia tăng hiệu quả ICSI, cải thiện kết cục điều trị.

## TIÊM TINH TRÙNG CÓ CHỌN LỌC HÌNH THÁI BÀO QUAN VÀO BÀO TƯƠNG NOÃN (IMSI)

Trong c-ICSI, hình thái tinh trùng được đánh

giá dưới độ phóng đại 200 – 400 lần, thông qua độ di động và hình thái bên ngoài. Do đó, những bất thường nhỏ của tinh trùng khó được xem xét chi tiết. Nhằm nâng cao hiệu quả chọn lọc tinh trùng, Bartoov và cộng sự (2001) đã giới thiệu phương pháp đánh giá hình thái tinh trùng di động ở độ phóng đại lớn (Motile Sperm Organelle Morphology Examination – MSOME), dựa trên kính hiển vi phản pha đảo ngược được trang bị hệ thống quang học Nomarski công suất cao, hình ảnh kỹ thuật số để đạt được độ phóng đại lên đến 6300 lần so với phương pháp thông thường. MSOME lựa chọn đánh giá sáu thành phần về hình dạng, mức độ phân bố đồng đều và lượng bào quan của tinh trùng: acrosome, thân, cổ, đuôi, ty thể và nhân (Perdrix và Rives, 2013). Việc sử dụng kỹ thuật này kết hợp với hệ thống vi thao tác cho phép phát triển quy trình



Hình 1. Tinh trùng được phân tích dưới độ phóng đại 6.300 trong IMSI.

(Nguồn: Centro Fecondazione Assistita)

ICSI cải tiến dưới độ phóng đại cao, hay còn gọi là tiêm tinh trùng có chọn lọc hình thái vào bào tương noãn (Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection – IMSI). Khoảng 2/3 tinh trùng được coi là bình thường sử dụng trong c-ICSI sẽ bị loại bỏ sau khi phân tích những đặc điểm về hình thái dưới độ phóng đại cao bằng IMSI (De Vos và cs., 2013) (Hình 1).

Antinori và cộng sự (2008), tiến hành RCT để đánh giá những ưu điểm của IMSI so với c-ICSI ở 446 cặp vợ chồng có tinh dịch đồ ít, yếu, dị dạng nặng và vợ dưới 35 tuổi. Kết quả cho thấy IMSI dẫn đến tỷ lệ có thai cao hơn so với c-ICSI (39,2% so với 26,5%;  $p=0,004$ ). Ngoài ra, nghiên cứu đã chứng minh rằng bệnh nhân với chu kỳ điều trị bằng c-ICSI  $\geq 2$ , được hưởng lợi nhiều nhất từ kỹ thuật IMSI về tỷ lệ thai lâm sàng (29,8% so với 12,9%;  $P=0,017$ ) (Antinori và cs., 2008). Tương tự, Knez và cộng sự (2011) cũng tiến hành trên 57 bệnh nhân để chứng minh IMSI cải thiện kết quả điều trị của chu kỳ sau so với chu kỳ trước không sử dụng IMSI về chất lượng phôi, khả năng phát triển và mang thai. Nhóm IMSI có tỷ lệ phát triển phôi nang cao hơn (80% so với 65%,  $p<0,05$ ) và số chu kỳ không phôi thấp hơn (0% so với 27,0%,  $p=0,048$ ) so với nhóm c-ICSI (Knez và cs., 2011). Tỷ lệ làm tổ (17,1% so với 6,8%) và tỷ lệ mang thai (25,0% so với 8,1%) cao hơn đã được quan sát thấy trong nhóm IMSI (Setti và cs., 2013). Ngoài ra, còn nhiều nghiên cứu khác chứng minh hiệu quả rõ rệt của IMSI so với c-ICSI trong ART, nhất là những trường hợp vô sinh do yếu tố nam nặng, các tác giả cũng khuyến cáo nên áp dụng IMSI trong thực hành lâm sàng.

Tuy nhiên, một số nghiên cứu đã cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về hiệu quả điều trị ART giữa IMSI và c-ICSI. Mauri và cộng sự (2010) đã thực hiện nghiên cứu “chia noãn” và đánh giá rằng IMSI không có cải thiện chất lượng ở nhóm phôi sớm (ngày 2) của 30 cặp vợ chồng (Mauri và cs., 2010). Bên cạnh đó, nghiên cứu của Marci và cộng sự (2013) khi phân tích hiệu

quả giữa 281 cặp vợ chồng thực hiện c-ICSI và 51 cặp vợ chồng thực hiện IMSI cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ thụ tinh (c-ICSI: 77,27%; IMSI: 80,00%), tỷ lệ làm tổ (c-ICSI: 16,83%; IMSI: 16,67%), tỷ lệ có thai (c-ICSI: 25,30%; IMSI: 23,50%), tỷ lệ sinh sống (c-ICSI: 11,39%; IMSI: 13,72%) (Marci và cs, 2013). Nghiên cứu của De Vos (2013) cũng cho kết quả tỷ lệ thụ tinh (79,1% và 77,3%) và phát triển của phôi đến ngày 5 của IMSI tương tự c-ICSI.

Ngoài ra, IMSI còn tồn tại một số nhược điểm đáng kể. Đầu tiên là vấn đề chi phí, IMSI đòi hỏi hệ thống thao tác, phân tích có độ phóng đại và độ phân giải cao để đánh giá chức năng tinh trùng, do đó cần chi phí lớn để đầu tư trang thiết bị. Tiếp theo, thời gian lựa chọn được tinh trùng cho IMSI là khá lâu, trung bình 2,5 giờ (khoảng 1,5 – 5,0 giờ) để lựa chọn đủ tinh trùng thực hiện tiêm cho 10 noãn (Berkovitz và cs., 2005). Do đó, đến nay việc áp dụng IMSI trong thực hành lâm sàng hay không vẫn là vấn đề còn tranh cãi. Trước hết, cần cân nhắc các vấn đề chi phí, quy trình kỹ thuật và hiệu quả điều trị trên từng nhóm bệnh nhân nhất định của IMSI để đạt được kết quả tốt nhất.

## CHỌN LỌC TINH TRÙNG DỰA TRÊN TÍNH CHIẾT QUANG

Theo các nghiên cứu sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua (Transmission Electron Microscopy – TEM), sự hiện diện của lưỡng chiết đầu tinh trùng phản ánh tính chất của tổ chức cấu trúc trong vùng nhân (do các sợi nucleoprotein tạo nên) và vùng acrosome (Baccetti và cs., 2004). Tính lưỡng chiết được cho rằng phản ánh chính xác quá trình cô đặc nhân ở đầu tinh trùng, qua đó phản ánh sự trưởng thành của tinh trùng, nhất là đối với những mẫu tinh trùng thu nhận từ thủ thuật, từ đó cung cấp thêm thông tin về việc lựa chọn tinh trùng trong ICSI. Sự bất thường của quá trình đóng gói nhiễm sắc thể tinh trùng và sự tái cấu trúc nhân không hoàn toàn xảy ra trong quá

trình sinh tinh có thể liên quan đến các dạng lưỡng chiết, được thể hiện bằng mối tương quan nghịch giữa tỷ lệ lưỡng chiết và sự phân mảnh DNA (Gianaroli và cs., 2008).

Gianaroli và cộng sự (2008) đã báo cáo rằng tỷ lệ tinh trùng lưỡng chiết có tương quan thuận với mật độ, sức sống và khả năng di động của mẫu. Tỷ lệ lưỡng chiết trung bình ở mẫu tinh trùng bình thường là 87% so với mẫu TESE 13,8%. Đối với nhóm tinh trùng bình thường về hình thái và khả năng di động, tỷ lệ lưỡng chiết toàn bộ là 59%, tỷ lệ lưỡng chiết một phần là 29%. Tuy nhiên vẫn còn một phần trong nhóm này bất thường về tỷ lệ lưỡng chiết. Tỷ lệ này giảm đáng kể xuống còn 53% (26% lưỡng chiết toàn bộ và 27% lưỡng chiết một phần) trong nhóm tinh trùng di động nhưng bất thường về hình thái (Gianaroli và cs., 2008). Khi đó, nếu lựa chọn các tinh trùng này cho ICSI bằng phương pháp thông thường (kính hiển vi đảo ngược ở độ phóng đại 200 – 400X và không có đánh giá lưỡng chiết), một phần lớn số noãn sẽ được tiêm tinh trùng bất thường mà phương pháp này không thể đánh giá được (Magli và cs., 2012). Khi so sánh giữa các tinh trùng có lưỡng chiết toàn phần và lưỡng chiết một phần đầu tinh trùng, Petersen và cộng sự (2011) đã báo cáo rằng sự phân mảnh DNA cao hơn đáng kể trong các tinh trùng có lưỡng chiết toàn phần (19,5%) so với các tinh trùng có chiết suất một phần (7,3%) (Petersen và cs., 2011). Ngoài ra, mức độ lưỡng chiết được cho rằng có liên quan đến cấu trúc acrosome. Cụ thể, lưỡng chiết toàn phần thể hiện tinh trùng có acrosome còn nguyên vẹn, trong khi lưỡng chiết một phần thể hiện tế bào tinh trùng đã trải qua phản ứng acrosome. Tỷ lệ làm tổ của phôi được ghi nhận cao hơn ở nhóm tiêm tinh trùng lưỡng chiết một phần (39,0%) so với nhóm tiêm tinh trùng lưỡng chiết toàn phần (8,6%) (Gianaroli và cs., 2010). Nhìn chung, ICSI có phân tích lưỡng chiết có thể giúp cải thiện về khả năng thụ tinh, phát triển và làm tổ của phôi. Điển hình, tỷ lệ phôi tốt ngày 3, khả năng làm tổ cũng như thai diễn tiến

sau 16 tuần cao hơn đáng kể so với nhóm chứng (Gianaroli và cs., 2008).

Như vậy, việc xác định lưỡng chiết tinh trùng giúp các chuyên viên phôi học có thể đánh giá mối tương quan về hình thái, tỷ lệ di động, cấu trúc acrosome, sự phân mảnh DNA tinh trùng. Qua đó, việc phân tích và lựa chọn tinh trùng trở nên dễ dàng hơn, giúp nâng cao hiệu quả điều trị.

### **Piezo-ICSI**

Đối với phương pháp c-ICSI, việc tiêm tinh trùng vào bào tương noãn được thực hiện thông qua một micropipette sắc nhọn ở đầu để có thể dễ dàng xuyên qua màng ZP (zona pellucida), và làm vỡ màng sinh chất. Quy trình này có thể gây vỡ bào tương đột ngột và phụ thuộc nhiều vào chuyên môn của chuyên viên phôi học. Phương pháp Piezo-ICSI đã được phát triển, ứng dụng đầu tiên vào năm 1996 và được coi như bước cải tiến so với c-ICSI, với kỳ vọng nâng cao hiệu quả và giảm tỷ lệ thoái hóa trong các chu kỳ ART. Piezo-ICSI sử dụng kết hợp micropipette có đầu bằng, dẹt với hệ chất lỏng kiểm soát áp lực (dựa trên fluorocarbon) và hệ thống xung truyền động. Tùy vào chất lượng noãn, có thể sử dụng xung lực với cường độ và tần suất khác nhau nhằm đạt hiệu quả cao nhất (Hiraoka và cs., 2021).

Kenichiro Hiraoka và cộng sự (2015) đã thực hiện nghiên cứu đánh giá hiệu quả của Piezo-ICSI so với ICSI thông thường. Nghiên cứu đã thực hiện trên 222 noãn trưởng thành từ 437 bệnh nhân, chia làm 3 nhóm: (i) 624 noãn thực hiện ICSI, (ii) 717 noãn thực hiện Piezo-ICSI với kim có độ dày thành 0,925  $\mu\text{m}$ , (iii) 679 noãn thực hiện Piezo-ICSI cải tiến với kim có độ dày thành 0,625  $\mu\text{m}$ . Kết quả cho thấy, hiệu quả thụ tinh, phát triển phôi và tỷ lệ trẻ sinh sống ở nhóm c-ICSI thấp hơn đáng kể có ý nghĩa thống kê so với nhóm thực hiện Piezo-ICSI và Piezo-ICSI cải tiến. Tỷ lệ thụ tinh lần lượt giữa 3 nhóm (i), (ii), (iii) là 68%, 75%, 89%. Tỷ lệ noãn thoái hóa trong nhóm 2



Piezo-ICSI là từ 1–5%, thấp hơn đáng kể so với nhóm c-ICSI (10%). Tương tự, tỷ lệ phôi tốt ngày 3 ở nhóm Piezo-ICSI cao hơn (43–55% so với 37%); tỷ lệ trẻ sinh sống cao hơn (25% so với 15%) so với c-ICSI (Hiraoka and Kitamura, 2015). Ngược lại, Kohyu Furuhashi và cộng sự (2019) đã tiến hành nghiên cứu trên 947 noãn trưởng thành, thực hiện c-ICSI và Piezo-ICSI thông qua phương pháp “chia noãn”. Kết quả của nghiên cứu cho thấy, không có khác biệt mang ý nghĩa thống kê khi so sánh hiệu quả của c-ICSI và Piezo-ICSI về các phương diện: tỷ lệ thụ tinh (c-ICSI: 70,1%, Piezo-ICSI: 75,4%); tỷ lệ thoái hóa (c-ICSI: 6,7%, Piezo-ICSI: 4,8%); tỷ lệ phát triển phôi nang (c-ICSI: 50,2%, Piezo-ICSI: 54,9%). Tuy nhiên, khi phân chia nhóm theo độ tuổi người mẹ, ở nhóm lớn tuổi (>35 tuổi), hiệu quả điều trị ở nhóm Piezo-ICSI cao hơn đáng kể có ý nghĩa thống kê so với nhóm c-ICSI trên các phương diện: tỷ lệ thụ tinh (74,8% so với 64,3%); tỷ lệ thoái hóa noãn (5,9% so với 7,5%), tỷ lệ phát triển phôi nang (52,4% so với 39,65%). Như vậy, Piezo-ICSI đã được chứng minh có hiệu quả trên nhóm bệnh nhân lớn tuổi, khi noãn đã có những thay đổi về chất lượng như giảm độ nhớt và độ đàn hồi màng tế bào (Furuhashi và cs., 2019). Gần đây, nghiên cứu của Zander–Fox và cộng sự (2021) thực hiện nghiên cứu so sánh hiệu quả của Piezo-ICSI và c-ICSI trên các noãn trưởng thành của 69 bệnh nhân. Theo dữ liệu công bố, Piezo-ICSI có kết quả về tỷ lệ thụ tinh cao hơn đáng kể ( $80,5 \pm 2,4\%$  so với  $65,8 \pm 2,3\%$ ,  $p < 0,0001$ ); tỷ lệ thoái hóa thấp hơn ( $4,4 \pm 1,3\%$  so với  $8,6 \pm 1,2\%$ ,  $P = 0,019$ ) và tỷ lệ thụ tinh bất thường thấp hơn ( $2,9 \pm 1,1\%$  so với  $7,4 \pm 1,1\%$ ;  $P = 0,003$ ) so với c-ICSI. Ngoài ra, tương tự như

nghiên cứu của Kohyu Furuhashi (2019), nghiên cứu này cũng cho thấy Piezo-ICSI có lợi nhất đối với nhóm bệnh nhân lớn tuổi ( $\geq 38$  tuổi) (Zander–Fox và cs., 2021) (Hình 2).

Từ những kết quả nghiên cứu trên cho thấy, hiện nay Piezo-ICSI đã được phát triển mạnh mẽ trong thực hành lâm sàng, với nhiều cải thiện về hiệu quả điều trị, đặc biệt là trên nhóm bệnh nhân lớn tuổi. Trong tương lai, Piezo-ICSI hoàn toàn có thể áp dụng rộng rãi trên nhiều trung tâm IVF, nhằm nâng cao chất lượng của các chu kỳ ART.

## HỆ THỐNG ICSI TỰ ĐỘNG (ROBOT ICSI)

Cùng với sự phát triển vượt bậc của khoa học kỹ thuật, tự động hóa kết hợp với trí tuệ nhân tạo (AI) được kỳ vọng sẽ thay thế các phương pháp thủ công hiện tại trong ART, đặc biệt là hệ thống ICSI tự động.

Zhe Lu và cộng sự (2011) đã báo cáo thử nghiệm đầu tiên về việc ứng dụng robot vào quá trình ICSI. Trong thử nghiệm này, di động và hình thái của tinh trùng được phân tích thông qua hệ thống xử lý với nhiều thuật toán phức tạp nhằm lựa chọn tinh trùng có chất lượng tốt nhất. Bước cố định tinh trùng cũng được thực hiện chính xác, và chỉ cần nhấp chuột để điều khiển bắt động tinh trùng. Tương tự, các thông số của noãn cũng được phân tích để có được vị trí ICSI tốt nhất. Trong nghiên cứu thực hiện robot ICSI trên 120 noãn Hamster và tinh trùng của người hiến tặng, thời gian trung bình ICSI mỗi noãn là 2 phút, tương đương với thao tác của một chuyên viên phôi học có kinh nghiệm. Kết quả, tỷ lệ ICSI thành công là 90%, tỷ lệ thoái



Hình 2. So sánh c-ICSI và Piezo-ICSI trong quá trình tiêm tinh trùng vào bào tương (Nguồn: Kenichiro và cs., 2015).

hóa là 9,3%. Nghiên cứu đã chứng minh tính hiệu quả của việc ứng dụng robot ICSI, là tiền đề cho những thử nghiệm ứng dụng trong thực hành lâm sàng (Lu và cs., 2011). Gần đây, nhiều nghiên cứu ứng dụng hệ thống tự động hóa trong nhận diện giao tử, bất động tinh trùng, xoay tế bào noãn tự động đã được tiến hành, đem lại những kết quả nhất định. Saadat và cộng sự (2018) đã phát triển phương pháp nhận dạng vị trí noãn bào tự động thông qua xác định vị trí thể cực, hình thái noãn và vị trí ICSI (Saadat và cs., 2018). Cùng với đó, Zhang đã phát triển hệ thống bất động tinh trùng dựa trên robot. Nghiên cứu tiến hành bất động 400 tinh trùng, với tỷ lệ nhận dạng đầu là 96%, xác định vị trí đuôi với độ chính xác  $1,08 \mu\text{m}$  trong nhiều điều kiện khác nhau, kể cả có sự tác động của nhiều tinh trùng khác. Tỷ lệ thành công chung của hệ thống này là 94,5%, không phụ thuộc vào vận tốc và hướng bơi của tinh trùng. Zenan Wang và cộng sự (2020) đã báo cáo nghiên cứu ứng dụng hệ thống xoay noãn theo mong muốn, dựa trên sự phân tích của hệ thống máy tính. Kết quả chứng minh hệ thống có khả năng nhận diện cấu trúc nội bào của noãn, và xoay định hướng noãn theo mong muốn (11,2 s/noãn). Hiệu quả tổng thể đạt 95%, nhanh hơn thao tác xoay thủ công của một chuyên viên phôi học có kinh nghiệm (Wang và cs., 2020).

Mặc dù hiện tại chỉ có một số ít nghiên cứu báo cáo về hiệu quả ứng dụng robot ICSI, tuy nhiên nó đã có những thành công nhất định. Trong tương lai, robot ICSI được kỳ vọng sẽ phát triển mạnh mẽ, nhằm giảm thời gian thao tác, tăng hiệu quả thực hành và khắc phục những hạn chế do thao tác khi tiến hành c-ICSI.

## KẾT LUẬN

c-ICSI đang dần trở nên phổ biến và là kỹ thuật quan trọng trong điều trị ART. Hiện nay, nhiều phương pháp cải tiến khác nhau đã được phát triển với kỳ vọng có thể ứng dụng rộng rãi, thay thế c-ICSI nhằm nâng cao hiệu quả điều trị. Tuy nhiên, cần cân nhắc ứng dụng các kỹ

thuật này ứng với từng nhóm đối tượng bệnh nhân cụ thể, và điều kiện của từng trung tâm nhất định để có thể phát huy hiệu quả tốt nhất. Trong tương lai, cần có nhiều đánh giá hơn về tính an toàn và hiệu quả, cũng như tiềm năng ứng dụng rộng rãi của các phương pháp ICSI cải tiến trước khi ứng dụng vào thực hành lâm sàng.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Berkovitz, A., Eltes, F., Yaari, S., Katz, 2005. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 20.
2. De Vos, A., Polyzos, N.P., Verheyen, G., Tournaye, H., 2013. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a critical and evidence-based review. *Basic Clin Androl* 23.
3. Furuhashi, K., Saeki, Y., Enatsu, N., 2019. Piezo-assisted ICSI improves fertilization and blastocyst development rates compared with conventional ICSI in women aged more than 35 years. *Reprod Med Biol* 18, 357–361.
4. Gianaroli, L., Magli, M.C., Collodel, G., 2008. Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertility and Sterility* 90, 104–112.
5. Hiraoka, K., Kitamura, S., 2015. Clinical efficiency of Piezo-ICSI using micropipettes with a wall thickness of  $0.625 \mu\text{m}$ . *J Assist Reprod Genet* 32, 1827–1833.
6. Knez, K., Zorn, B., Tomazevic, T., 2011. The IMSI procedure improves poor embryo development in the same infertile couples with poor semen quality: a comparative prospective randomized study. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 123.
7. Magli, M.C., Crippa, A., Muzii, L., Boudjema, 2012. Head birefringence properties are associated with acrosome reaction, sperm motility and morphology. *Reproductive BioMedicine Online* 24, 352–359.
8. Zander-Fox, D., Lam, K., Pacella-Ince, 2021. PIEZO-ICSI increases fertilization rates compared with standard ICSI: a prospective cohort study. *Reproductive BioMedicine Online* 0.

Tiếp theo bài ở trang 29 ➔ **CHUYỂN PHÔI TRỮ HAY PHÔI TƯƠI TRONG ĐIỀU TRỊ ...**

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bosdou JK, Venetis CA, Tarlatzis BC, Grimbizis GF, Kolibianakis EM. Higher probability of live-birth in high, but not normal, responders after first frozen-embryo transfer in a freeze-only cycle strategy compared to fresh-embryo transfer: a meta-analysis. *Hum Reprod*. 2019; 34(3):491–505.
2. Boynukalin FK, Turgut NE, Gultomruk M, Ecmis S, Yarkiner Z, Findikli N, và cộng sự Impact of elective frozen vs. fresh embryo transfer strategies on cumulative live birth: Do deleterious effects still exist in normal & hyper responders? *PLOS ONE*. 2020;15(6):1–15.
3. Chen ZJ, Shi Y, Sun Y, Zhang B, Liang X, Cao Y, và cộng sự Fresh versus frozen embryos for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 2016; 375(6):523–33.
4. Le KD, Vương LN, Ho TM, Dang VQ, Phạm TD, Phạm CT, và cộng sự A cost-effectiveness analysis of freeze only or fresh embryo transfer in IVF of non-PCOS women. *Hum Reprod*. 2018; 33(10):1907–14.
5. [5] Roque M, Haahr T, Geber S, Esteves SC, Humaidan P. Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: A systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Hum Reprod Update*. 2019; 25(1):2–14.
6. Roque M, Valle M, Sampaio M, Geber S. Obstetric outcomes after fresh versus frozen-thawed embryo transfers: A systematic review and meta-analysis. *JBRA Assist Reprod*. 2018; 22(3):253–60.
7. Vương LN, Dang VQ, Ho TM, Huỳnh BG, Hà DT, Phạm TD, và cộng sự IVF transfer of fresh or frozen embryos in women without polycystic ovaries. *N Engl J Med*. 2018; 378(2):137–47.
8. Vương LN, Ph D, Ly T, Nguyen A, Ph D. Development of children born from freeze-only versus fresh embryo transfer: follow-up of a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2020; 114(4):1–8.
9. Wei D, Liu JY, Sun Y, Shi Y, Zhang B, Liu JQ, và cộng sự Frozen versus fresh single blastocyst transfer in ovulatory women: a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2019; 393(10178):1310–8.