

ẢNH HƯỞNG CỦA KHÔNG BÀO TRONG QUÁ TRÌNH PHÁT TRIỂN PHÔI

CN. Khổng Tiết Mây Như, CN. Đặng Thị Huyền Trang

IVFMD Tân Bình, Bệnh viện đa khoa Mỹ Đức

GIỚI THIỆU

Không bào xuất hiện ở nhiều loại tế bào khác nhau và đảm nhận vai trò chức năng khác nhau. Ở thực vật, không bào đóng vai trò quan trọng trong việc trữ nước và duy trì pH nội bào, giúp thực vật nảy mầm và sinh trưởng nhanh, chứa thức ăn dưới dạng phân tử nhỏ cho tế bào, cô lập vật liệu lạ gây hại tế bào chủ và thải những chất không cần thiết khỏi tế bào. Trong khi đó, không bào ở tế bào động vật thì có kích thước trong tế bào chất nhỏ hơn nhiều, chứa hợp chất hữu cơ và enzyme được kích hoạt bởi tín hiệu ngoại bào giúp hỗ trợ chủ yếu tiêu hóa nội bào, bài tiết và co bóp. Đặc biệt hơn, với tế bào sinh dục thì không bào xuất hiện ở tinh trùng được xem là bất thường khi chiếm hơn 20,28% diện tích đầu, có nhiều hơn hai không bào nhỏ trong cực đầu (acrosome) sẽ làm giảm phản ứng cực đầu hoặc xuất hiện từ một không bào trong nhân gây cản trở sự co nhiễm sắc chất, hậu quả là làm giảm tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ làm tổ cũng như tỷ lệ thai. Tương tự, khi có sự hiện diện của không bào lớn sẽ ảnh hưởng tới sự sắp xếp các bào quan trong tế bào chất của noãn, gây lệch trục mặt phân cắt, dẫn đến phôi phân chia không đồng đều.

Noãn phát triển từ giai đoạn túi mầm (Germinal Vesicles – GV) lên trung kỳ II (Metaphase II – MII) có một thể cực, sau thụ tinh, phôi phát triển bình thường sẽ trải qua giai đoạn phân chia, hai phôi bào vào ngày 1, bốn phôi bào vào ngày 2, tám phôi bào vào ngày 3 rồi đến giai đoạn phôi dâu và cuối cùng là phôi nang vào ngày 5. Trong suốt quá trình phát triển của phôi, sự xuất hiện và hợp nhất của hai tiền

nhân, các phôi bào phân chia đồng đều, nén rồi giải nén, phát triển thành phôi nang chất lượng tốt. Tuy nhiên, bất thường vẫn có thể xảy ra với tần suất không nhỏ và không bào là hiện tượng rối loạn hình thái có thể xuất hiện trong quá trình phát triển từ giai đoạn noãn đến giai đoạn hợp tử và hình thành phôi sau đó.

KHÔNG BÀO

Định nghĩa

Không bào xuất hiện ở nhiều loại tế bào khác nhau, đảm nhiệm các vai trò và chức năng khác nhau. Điển hình là không bào ở thực vật chiếm 90% thể tích tế bào, lưu trữ nước và duy trì pH nội bào giúp cho thực vật có thể nảy mầm và sinh trưởng nhanh hơn, chứa các thức ăn dưới dạng phân tử nhỏ cung cấp cho tế bào, cô lập vật liệu lạ gây hại cho tế bào chủ và tổng xuất những chất không cần thiết ra khỏi tế bào.

Không bào (Vacuoles – Vac) được định nghĩa là một túi chứa dịch lỏng xuất hiện ở bào tương noãn, không có hình dạng và kích thước cơ bản, cấu trúc biến đổi theo nhu cầu của tế bào. Đây là dạng bất thường tế bào chất phổ biến nhất ở noãn và phôi (Alpha và ESHRE, 2011). Hầu hết các bài nghiên cứu về không bào trong noãn và phôi đều định nghĩa không bào là kết quả hợp nhất túi dịch còn tồn tại từ trước của mạng lưới nội chất hoặc bộ máy Golgi tạo ra dịch thể chứa đầy chất lỏng cản trở khung xương của tế bào (Campbell và cs., 2015) (Hình 1).

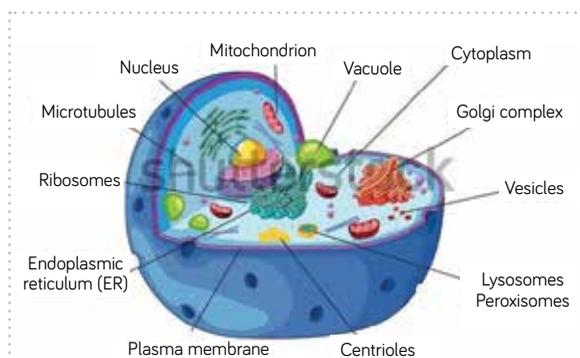
Nguyên nhân – cơ chế hình thành

Thông thường, trong hoạt động sống của tế bào, hoạt động bơm Na^+ và K^+ giúp cân bằng

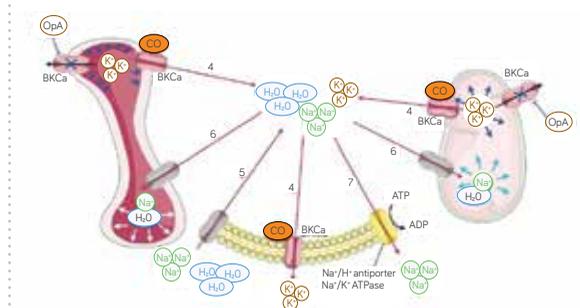
quá trình đẩy và hút các chất qua màng, giúp giữ áp suất thẩm thấu trong tế bào ổn định, như vậy tế bào sẽ không bị trương và chết. Hoạt động này sẽ theo cơ chế là cứ 3Na^+ ra ngoài thì 2K^+ đi vào trong vì màng tế bào ít thẩm Na^+ hơn K^+ . Tuy nhiên, nếu nồng độ K^+ thấp bởi ảnh hưởng của thẩm thấu thì Na^+ và nước sẽ đi vào tế bào, lưới nội chất (Endoplasmic Reticulum – ER) và ty thể nhiều hơn để bù lại áp lực thẩm thấu bởi sự khuếch tán của nước vào trong ER. Kết quả là làm tăng khối lượng tế bào, gây phình ty thể và tạo ra không bào trong ER. Bên cạnh đó, K^+ được hoạt hóa bằng Ca^{2+} (BKCa) khu trú trên ER và ty thể cũng như màng sinh chất của tế bào nên nếu nồng độ Ca^{2+} quá thấp dẫn đến kênh BKCa bị ức chế sẽ làm tăng quá mức nồng độ K^+ trong ER, gây phình ti thể và tạo ra không bào (Shubin và cs., 2016) (Hình 2).

Phân loại

Không bào có nhiều loại khác nhau được thấy trong noãn bào và hợp tử (Campbell và cs., 2015). Chúng đa dạng về kích thước, xuất hiện ở bất kỳ giai đoạn phát triển nào, thường ở khoảng 0,35 – 81,4 giờ sau ICSI dựa trên thống kê của



Hình 1. Không bào trong tế bào động vật.



Hình 2. Cơ chế hình thành không bào. (Shubin và cs., 2016)

Atlas Timelapse nhưng trong số liệu của Zhang năm 2018 là $73,3 \pm 9,3$ giờ sau ICSI (Bảng 1).

Trong đánh giá chất lượng noãn và phôi, không bào chia thành bốn loại như sVac – một không bào nhỏ có kích thước nhỏ hơn $10 \mu\text{m}$, sVacs – nhiều không bào nhỏ có từ 2 không bào nhỏ hơn $10 \mu\text{m}$, bVac – một không bào lớn có kích thước hơn $14 \mu\text{m}$ và bVacs – nhiều không bào lớn hơn $14 \mu\text{m}$. Ước lượng kích thước của không bào trên phôi thường sẽ dựa vào bán kính của màng trong suốt (Zona pellucida – ZP) vì ZP có kích thước 12 – $14 \mu\text{m}$. Trong đồng thuận Alpha 2016 về đánh giá phôi, ở bất kỳ giai đoạn phân chia nào, nếu có một không bào nhỏ với kích thước nhỏ hơn $15 \mu\text{m}$ sẽ hạ bậc phôi đó hoặc xếp phôi loại III nếu có một không bào lớn hoặc hai không bào nhỏ.

Tần suất

Theo thống kê của Rienzi năm 2008, sự hiện diện của không bào chỉ chiếm tỷ lệ 3,1% trong giai đoạn noãn MII. Tỷ lệ phôi có ít nhất một không bào xuất hiện trong quá trình phát triển là 36,6% (Ebner và cs., 2005), cụ thể tần suất không bào hiện diện ở giai đoạn phôi đầu là 20% cao hơn rất nhiều so với không bào ở giai đoạn phôi phân chia (2 – 8 phôi bào) (Zhang và cs., 2018) và tỷ lệ này giảm đi nhiều khi phát triển thành phôi nang (6,5%). Điều đặc biệt là trong thống kê của Mayer năm 2018, tỷ lệ không bào hiện diện tế bào lá nuôi (Trophectoderm – TE) là 17% nhiều hơn trong khối tế bào bên trong (Inner Cell Mass – ICM) là 2,4%. Sự khác biệt này là do ở phôi nang có cơ chế giảm thiểu tác động tiêu cực của không bào đối với ICM vì ICM là nơi chứa bộ nhiễm sắc thể và sẽ phát triển thành bào thai sau này nên phôi sẽ ưu tiên bảo vệ ICM và tổng xuất những nhân tố không phải là vật liệu di truyền ra ngoài TE. Khi so sánh đến hai kỹ thuật ICSI và IVF, tần suất không bào xuất hiện trong hợp tử (11,6%), phôi ngày 2 (12,1%), phôi ngày 3 (13,7%), và phôi ngày 4 (10,9%) ở ICSI nhiều hơn IVF với tỷ lệ lần lượt là 5,3%; 8,2%; 10,2% và 8,5% (Ebner và cs., 2005). Theo Atlas Timelapse 2015, không bào trong tế bào

noãn ở ICSI là 6,3% vẫn cao hơn hẳn ở IVF là 3,7% có thể là do kỹ thuật của người thao tác ICSI nên lượng môi trường được tiêm vào bào tương noãn phần nào đó hình thành nên không bào, tạo ra sự chênh lệch về tần suất giữa hai kỹ thuật này. Trong vài trường hợp, không bào chỉ ở giai đoạn sớm của sự phát triển phôi và biến mất sau giai đoạn phân chia đầu tiên hoặc hiện diện trong noãn và giữ nguyên không thay đổi trong suốt quá trình phát triển phôi sau đó và cũng có thể biến mất ở giai đoạn phôi nang. Tuy nhiên, nếu không bào xuất hiện trong tế bào noãn, thay đổi số lượng đa dạng và tăng trưởng lớn hơn qua các giai đoạn phân chia ảnh hưởng rất tiêu cực đến sự phát triển của phôi (Hình 3).

ẢNH HƯỞNG CỦA KHÔNG BÀO ĐẾN KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ

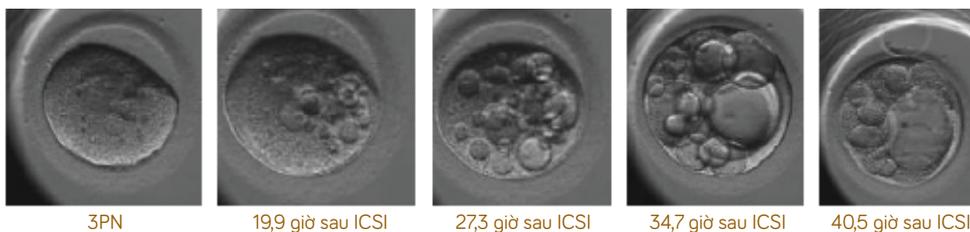
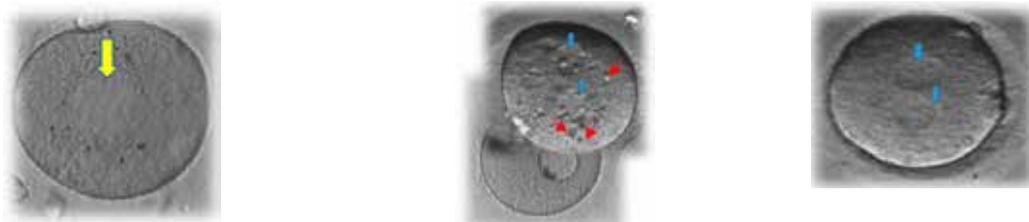
Tỷ lệ thụ tinh

Hầu hết các nghiên cứu đều tập trung vào không bào ở noãn, một dạng bất thường hình thái noãn vì có tương quan tỷ lệ thụ tinh và sự phát triển hoàn thiện của phôi sau này. Theo

thống kê phân tích được dựa trên kích thước của không bào hình thành trong tế bào chất của noãn trưởng thành (Ebner và cs., 2005), trong 47 noãn có chứa không bào thì số noãn có một, hai và nhiều không bào lần lượt là 66%; 21,3% và 12,7%. Kết quả cho thấy tỷ lệ thụ tinh ở nhóm noãn có chứa nhiều không bào (43,8%) thấp hơn nhiều so với nhóm noãn không có không bào (65,3%) và chứa một không bào (51,6%). Ebner và cộng sự cũng lần đầu chứng minh được tỷ lệ thụ tinh sẽ giảm đáng kể đối với noãn có chứa không bào với kích thước lớn hơn 14 μm . Một trường hợp được báo cáo vào vài năm sau đó về ảnh hưởng tiêu cực của không bào lớn đến tỷ lệ thụ tinh trên một bệnh nhân trước đó đã được cấy IVF sau 4 năm không thể mang thai tự nhiên nhưng thất bại ở giai đoạn thụ tinh (Wallbutton và cs., 2010). Trong chu kỳ ICSI lần 1, khi chuyển 2 trong 8 phôi có 3,4 tế bào không bào cho ra kết quả thai. Đến chu kỳ ICSI thứ 2, khi chuyển 2 trong 7 phôi có 5, 6 tế bào cũng không thể thụ thai. Những phôi còn lại trong cả hai chu kỳ đều bị ngưng phát triển vào N3 khi chỉ

Bảng 1. Phân biệt hình dạng không bào (Eshere, 2016).

Thể lưới nội chất chất trơn (Smooth endoplasmic reticulum cluster – sERC)	Không bào (Vacuoles – Vac)	Tiền nhân (Pronuclear – PN)
Hình dạng lóng lánh, trơn nhưng không quan sát được ở kích thước nhỏ 2-9 μm .	Màng trong suốt rõ ràng hơi lõm vào tế bào chất và kích thước dù nhỏ vẫn quan sát được dưới kính. Không bào kích thước nhỏ có độ lõm sâu hơn trong tế bào chất cũng như độ dày hơn ở màng của chúng.	Màng mỏng hơn, độ lõm ít hơn và có hạch nhân.



Hình 3. Không bào từ hợp tử 3 tiền nhân đa dạng về số lượng và gia tăng kích thước, gây ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát triển của phôi (Campbell và cs., 2015).

mới 3, 4 tế bào. Một điều kỳ lạ là cả ba lần thụ tinh nhân tạo đều có sự hình thành của không bào đồng nhất về kích thước lớn hơn $25 \mu\text{m}$ và cho ra tỷ lệ thụ tinh chỉ còn 50% và tỷ lệ tạo phôi N3 rất thấp chỉ khoảng 20%. Các tác giả của bài báo cho rằng hiện tượng đồng nhất này có thể là do yếu tố di truyền trong túi noãn suốt quá trình hình thành bào thai dẫn đến không kiểm soát được nội bào hay sự mất cân bằng trong quá trình hợp nhất giữa các túi dịch trong mạng lưới nội chất gây ra không bào. Tuy nhiên, không phải không bào lớn nào cũng có thể gây ảnh hưởng đến tỷ lệ thụ tinh như một trường hợp khác được báo cáo bởi Fancsovits và cộng sự (2011), cụ thể là trong 81,3% số noãn thu được từ dịch nang sau chọc hút đều chứa ít nhất là một không bào lớn với kích thước trung bình là $52,5 \mu\text{m}$ nhưng vẫn có thể thụ tinh. Sau đó, người ta tiến hành chuyển 3 phôi có 2, 4 tế bào thì cho ra đơn thai và sinh được một bé gái khỏe mạnh. Tương tự, đến năm 2016 trong một bài báo cáo khác của Deene và cộng sự, khi kích thích ICSI cho 18 noãn thu đều chứa một không bào lớn trong tế bào chất của mỗi noãn cho ra tỷ lệ thụ tinh là 83,3% và phát triển thành phôi N3 chất lượng tốt, kết quả cũng ra được đơn thai khi chuyển 3 trong 15 phôi N3.

Tỷ lệ phôi nang

Gần đây nhất là nghiên cứu của Mayer và cộng sự (2018) trên 424 bệnh nhân với cỡ mẫu cho 2 nhóm phôi N4 chứa không bào và không có không bào với số cụm trứng lần lượt là 170 và 1.430 thì cho ra tỷ lệ tạo phôi nang N5 ở nhóm phôi có không bào là 49% thấp hơn nhiều so với nhóm phôi không có không bào là 63,4%, kết quả là tỷ lệ trẻ sinh sống ở nhóm chứa không bào giảm đáng kể. Báo cáo đề cập đến sự tự phát muộn của không bào ở phôi N4 tạo ra khoảng không gian lớn hơn như là khoang phôi nang

riêng, do đó làm giảm số tế bào do không bào của phôi ở giai đoạn phân chia muộn làm mất một số lượng tế bào ở phôi nang và đưa ra giả thuyết rằng những phôi như vậy chẳng bao lâu sẽ ngừng phát triển và không thể làm tổ. Cùng năm đó, nhóm các nhà nghiên cứu ở Trung Quốc cũng đồng quan điểm với kết quả của nhóm Mayer và bổ sung nghiên cứu về chất lượng phôi nang bị ảnh hưởng bởi không bào, cụ thể là phôi N3, N4 có chứa không bào cho ra tỷ lệ phôi nang bình thường và chất lượng tốt lần lượt là 78,7% và 59,2% thấp hơn nhiều so với nhóm không có không bào là 88,3% và 71,0%. Kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm phôi N3, N4 có không bào tác động tiêu cực đến chất lượng phôi nang và làm tăng tỷ lệ phôi nang kém hoặc không dùng được. Một điều đặc biệt là thời điểm xuất hiện không bào càng muộn thì số phôi bào có chứa không bào ngày càng nhiều và chất lượng phôi nang càng bị ảnh hưởng. Vì vậy, tỷ lệ không bào xuất hiện ở phôi nang có thể là một chỉ số đánh giá về tiềm năng phát triển của phôi (Bảng 2).

Tỷ lệ thai lâm sàng

Đã từng có nghiên cứu về mối tương quan giữa các bất thường về hình thái của noãn đến tỷ lệ thụ tinh, phát triển phôi và tỷ lệ thai lâm sàng và có đề cập đến không bào (Loutradis và cs., 1999). Khi so sánh trong hai nhóm phôi chất lượng tốt (A) và chất lượng kém (B) thì người ta cho thấy rằng tỷ lệ thụ tinh và tạo phôi N3 ở nhóm B lần lượt là 72,5% và 53,4% thấp hơn nhóm A (76,1% và 65,9%) cũng như là sự giảm đột biến ở tỷ lệ thai lâm sàng ở nhóm B (5,5%) so với A (29,4%). Đồng thời, đến năm 2018, Zhang và cộng sự cũng chứng minh được rằng sự xuất hiện của không bào ở giai đoạn phôi nang gây tăng tỷ lệ sảy thai (16,0%) trong khi tỷ lệ này chỉ chiếm 7,5% ở nhóm phôi nang không chứa không bào.

Bảng 2. Tỷ lệ không bào xuất hiện ở phôi nang. (Zhang và cs, 2018)

Chất lượng phôi nang	Tốt nhất	Tốt	Trung bình	Không dùng được
Thời gian xuất hiện không bào	73,4 ± 8	73 ± 8,9	73,9 ± 8,3	74,1 ± 10,2
% Phôi bào có không bào	13,3%	20,8%	26,7%	34%

GIẢI PHÁP XỬ LÝ KHÔNG BÀO

Như vậy, các chuyên viên phôi học thường sẽ không ưu tiên việc chuyển phôi chứa không bào nếu phôi bình thường của bệnh nhân nhiều nhưng nếu trong những trường hợp phôi tốt hạn chế thì phải cân nhắc đến việc dùng phôi chứa không bào. Năm 2010, Wall Button và cộng sự đã từng đề cập đến kỹ thuật điều chế vi mô hiện đại (Micromanipulation) giúp loại bỏ khối bào tương không bào tương tự như là trong chuyển nhân bằng thao tác chọc thủng không bào với kim ICSI hoặc kim sinh thiết và xử lý dịch bên trong không bào có thể giảm sự biến dạng cấu trúc của thoi vô sắc và khung xương tế bào do đó sẽ cho phép quá trình phát triển diễn ra bình thường. Tuy nhiên, xử lý không bào có thể làm giảm khối lượng tế bào chất gây bất lợi cho sự phát triển. Hơn nữa, việc chọc thủng và xử lý dịch không bào có thể gây vỡ dịch làm xáo trộn bào tương noãn. Hiện nay, kỹ thuật này vẫn chưa được đưa vào điều trị lâm sàng vì đây là một kỹ thuật xâm lấn, xử lý không bào như vậy làm ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi nên việc giảm tối đa sự tác động bên ngoài vào noãn và phôi trong giai đoạn phát triển luôn là tiêu chí quan trọng hơn hết. Vì vậy, cho đến hiện tại vẫn chưa có giải pháp không xâm lấn nào có thể giúp xử lý không bào mà không làm ảnh hưởng đến phôi.

KẾT LUẬN

Tóm lại, sự xuất hiện của không bào có thể làm giảm tỷ lệ thụ tinh, sự phát triển phôi và tỷ lệ thai lâm sàng. Không bào hiện diện nhiều nhất ở phôi dâu và trong TE của phôi nang cũng như tần suất tồn tại ở kỹ thuật ICSI nhiều hơn IVF. Bên cạnh đó, thời điểm xuất hiện không bào càng muộn thì tỷ lệ tạo phôi nang, chất lượng phôi nang càng bị ảnh hưởng và hậu quả là làm tăng tỷ lệ sảy thai. Tuy nhiên, các bài nghiên cứu báo cáo về không bào trong noãn và phôi vẫn còn đang hạn chế, mẫu và số liệu vẫn còn giới hạn khi hầu hết các phôi có chứa không bào sẽ không được chuyển nếu có nhiều lựa chọn.

Vì vậy, mức độ ảnh hưởng của không bào đến sự phát triển của phôi và tỷ lệ thụ tinh, mang thai và trẻ sinh ra vẫn còn đang gây nhiều tranh cãi và cần được nghiên cứu thêm trong tương lai. Không những vậy, kỹ thuật Micromanipulation còn hạn chế do xâm lấn đến tế bào chất của phôi nên cần tìm hướng xử lý không bào tốt hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Campbell A, Fishel S. (2015). Time lapse embryology.
2. Ebner T, Ph D, Moser M. và cộng sự. (2005). Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. 83(6).
3. Eshre. (2016). Atlas of Human Embryology. SIG Embryology. <https://atlas.eshre.eu/es/14609770534671150>.
4. Fancovits P, Murber A, Gilán Z.T. và cộng sự. (2011). Human oocytes containing large cytoplasmic vacuoles can result in pregnancy and viable offspring. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(4), 513 – 516.
5. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K. và cộng sự. (1999). Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 72(2), 240 – 244.
6. Mayer R.B, Shebl O và Oppelt P. (2018). Good – quality blastocysts derived from vacuolated morulas show reduced viability. *Fertility and Sterility*, 109(6), 1025 – 1029.
7. Shubin A.V, Demidyuk I.V, Komissarov A.A. và cộng sự. (2016). Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. 7(34).
8. Deene V, Mudaraddi T.Y, Gaur S.S. (2016). A Case Study on Vacuolated Oocytes Intracytoplasmic Sperm Injection and its Outcome. 7(April), 23 – 26.
9. Rienzi L, Ubaldi F.M, Iacobelli M. và cộng sự. (2008). Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertility and Sterility*, 90(5), 1692 – 1700.
10. Wallbuton S, và Kasraie J. (2010). Vacuolated oocytes : fertilization and embryonic arrest following intra – cytoplasmic sperm injection in a patient exhibiting persistent oocyte macro vacuolization – Case report. 183 – 188.
11. Zhang J, Zhong W, Liu H. và cộng sự. (2018). Using time – lapse technology to explore vacuolization in embryos on Day 3 and Day 4. *Archives of Gynecology and Obstetrics*.

Tiếp theo bài
ở trang 67 → KỸ THUẬT TIÊM TINH TỬ TRÒN
VÀO BÀO TƯƠNG NOÃN

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aslam I, Fishel S, Green S, Campbell A, Garratt L, McDermott H, et al. Can we justify spermatid microinjection for severe male factor infertility? *J Human Reprod Update* 1998;4:213 – 22.
2. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. ROSI, instructions for use: 1997 update. Round spermatid injection. *J Human Reprod* 1998;13:519 – 23.
3. Vanderzwalmen P, Lejeune B, Nij M, Segal – Bertin G, Vandamme B, Schoysman R. Fertilization of an oocyte microinjected with a spermatid in an in – vitro fertilization programme. *J Human Reprod* 1995;10:502 – 3.
4. Tesarik J, Mendoza C. Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. *J Human Reprod* 1996;11:772 – 9.
5. Antinori S, Versaci C, Dani G, Antinori M, Selman H. Successful fertilization and pregnancy after injection of frozen – thawed round spermatids into human oocytes. *J Human Reprod* 1997;12:554 – 6.
6. Tanaka A, Nagayoshi M, Takemoto Y, Tanaka I, Kusunoki H, Watanabe S, et al. Fourteen babies born after round spermatid injection into human oocytes. *Proc Natl Acad Sci* 2015;112:14629 – 34.
7. Tanaka A, Suzuki K, Nagayoshi M, Tanaka A, Takemoto Y, Watanabe S, Takeda S, Irahara M, Kuji N, Yamagata Z, Yanagimachi R (2018) Ninety babies born after round spermatid injection into oocytes: survey of their development from fertilization to 2 years of age. *Fertil Steril* 110(3): 443 – 450.
8. Tekayev M, Vuruskan AK. Clinical values and advances in round spermatid injection (ROSI). *Reprod Biol*. 2021 Sep;21(3):100530.
9. Hanson BM, Kohn TP, Pastuszak AW, Scott RT Jr, Cheng PJ, Hotaling JM. Round spermatid injection into human oocytes: a systematic review and meta – analysis. *Asian J Androl*. 2021 Jul – Aug;23(4):363 – 369.
10. Minh N, Tu N, Tram N, Bui H – T, Van Thuan N. Histone deacetylase inhibitor corrects histone H3K9 modification in round spermatid DNA at the 2 – cell stage and increases the development of ROSI embryos. *International Conference on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam* 2017;877 – 81, doi: http://dx.doi.org/10.1007/978 – 981 – 10 – 4361 – 1_149 Springer.