

Đánh giá chất lượng phôi các giai đoạn khi nuôi cấy trong môi trường nồng độ oxy thấp

Nguyễn Linh Chi^{1,2*}, Ngô Thị Tường Châu², Nguyễn Đình Tảo¹, Nguyễn Ngọc Diệp³

¹Bệnh viện Đa khoa 16A Hà Đông

²Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Học viện Quân y

Ngày nhận bài 20/5/2021; ngày chuyển phản biện 24/5/2021; ngày nhận phản biện 14/6/2021; ngày chấp nhận đăng 18/6/2021

Tóm tắt:

Mục tiêu: đánh giá chất lượng phôi dựa vào hình thái khi nuôi cấy ở nồng độ oxy thấp (5%) ở các giai đoạn phát triển của phôi: ngày 3, ngày 5. **Phương pháp:** đánh giá phân tích dựa trên 168 chu kỳ IVF/ICSI từ tháng 10/2019 đến tháng 2/2021, sử dụng 2 loại tủ nuôi cấy: tủ nuôi cấy 3 khí K-system G-210 (Úc) (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) và tủ nuôi cấy 2 khí Thermo Scientific 371 (Đan Mạch) (5% CO₂, 75% N₂) và sử dụng nồng độ oxy theo khí quyển. Noãn trưởng thành (MI và MII) được nuôi cấy trong môi trường đa bước G1-PLUSTM (Vitrolife) đến ngày 3, và thay sang môi trường G2-PLUSTM (Vitrolife) từ ngày 3 đến ngày 5. Lựa chọn bệnh nhân <37 tuổi, AMH>1,2 ng/ml, AFC≥4. Phôi sẽ được kiểm tra ngày thụ tinh, ngày 3 và 5. **Kết quả:** chất lượng của phôi ngày 3 không có sự khác biệt đáng kể giữa 2 nhóm nuôi cấy (tỷ lệ phôi tốt và trung bình chiếm 77,28±4,62% và 77,99±5,03% với p>0,05, số lượng phôi xấu chiếm 1,71±0,38 so với 1,97±0,49 với p>0,05). Kết quả phôi ngày 5 cho thấy, tỷ lệ phôi phát triển từ ngày 1 lên ngày 5, cũng như tỷ lệ phôi loại tốt và trung bình có chiều hướng tăng cao hơn (p<0,05) ở nồng độ oxy thấp so với nhóm oxy 20% (lần lượt là 57,79±3,60% so với 53,05±4,50% và 78,62±4,42% so với 70,97±5,67%). **Kết luận:** nuôi cấy phôi trong môi trường nồng độ oxy thấp giúp phôi phát triển đến giai đoạn ngày 5 tốt hơn so với khi nuôi cấy ở nồng độ khí quyển.

Từ khóa: IVF, môi trường nuôi cấy, nồng độ oxy thấp, nuôi cấy phôi nang.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Thụ tinh trong ống nghiệm (In vitro fertilization - IVF) là kỹ thuật điều trị vô sinh - hiếm muộn, trong đó, tinh trùng của người chồng và trứng của người vợ sẽ được thụ tinh trong phòng thí nghiệm để tạo thành phôi. Tạo môi trường tối ưu cho nuôi cấy phôi là bước rất quan trọng để đảm bảo khả năng hình thành phôi và nuôi phôi, từ đó duy trì được kết quả ổn định của thai kỳ. Ngoài môi trường nuôi cấy phôi, sự phát triển của phôi còn phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố khác như: nhiệt độ, oxy, ánh sáng..., trong đó, oxy rất cần thiết cho quá trình trao đổi chất của phôi nhưng lại là con dao hai lưỡi vì có thể làm tổn hại đến phôi thai đang phát triển bởi sự oxy hóa [1].

Trong tự nhiên, noãn và phôi phát triển trong tử cung mẹ có nồng độ oxy dao động trong khoảng 2-8% [2], trong khi hiện tại các tủ nuôi cấy IVF truyền thống có nồng độ oxy là 20%. Có nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh nồng độ oxy cao gây độc với phôi, và nếu được nuôi trong điều kiện oxy giống với môi trường tự nhiên, phôi sẽ tăng tỷ lệ phát triển thành phôi nang cũng như tăng tỷ lệ đậu thai [3, 4]. Hiện nay, vẫn chưa có kết luận khẳng định về việc sử dụng nồng độ oxy thấp có thực sự mang lại lợi ích tốt hơn cho phôi khi nuôi cấy trong môi trường nhân tạo.

*Tác giả liên hệ: Email: Linhchi148@gmail.com

Xu hướng các nghiên cứu đều thể hiện kết quả tích cực khi nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy thấp. Tuy nhiên, các kết quả này còn nhiều tranh cãi, nên vẫn còn quá sớm để khuyến nghị nuôi cấy phôi hoàn toàn ở nồng độ oxy thấp. Trong lịch sử, nuôi cấy phôi thụ tinh trong ống nghiệm thường sử dụng nuôi cấy ở nồng độ oxy trong không khí bằng các tủ nuôi cấy phôi chỉ với cảm biến điều chỉnh nồng độ CO₂. Nếu chuyển sang nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy thấp, cần thay đổi toàn bộ các thiết bị nuôi cấy với chi phí tốn kém cho đầu tư mua tủ nuôi cấy 3 khí hoặc khí trộn. Ngoài ra, để duy trì phôi ở nồng độ này cần cung cấp khí nitơ hoặc hệ thống khí trộn, do đó cũng làm tăng đáng kể các chi phí.

Vì vậy, mục tiêu nghiên cứu của đề tài là đánh giá ảnh hưởng của nồng độ oxy trong khí quyển 20% và nồng độ oxy thấp 5%, từ đó định hướng sử dụng nồng độ oxy tối ưu cho nuôi cấy phôi người.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 10/2019 đến tháng 2/2021, dựa trên các chu kỳ IVF/tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Đa khoa 16A Hà Đông. Nghiên cứu sử dụng tủ nuôi cấy 3 khí K-system G-210 (Úc) hoặc tủ nuôi cấy 2 khí Thermo

Evaluation of the quality of embryo based on morphology cultured at low oxygen concentration

Linh Chi Nguyen^{1,2*}, Thi Tuong Chau Ngo²,
Dinh Tao Nguyen¹, Ngoc Diep Nguyen³

¹16A Ha Dong General Hospital

²Department of Environment, University of Science, VNU, Hanoi

³Vietnam Military Medical University

Received 20 May 2021; accepted 18 June 2021

Abstract:

Objectives: evaluating the quality of embryo morphology cultured at low oxygen concentration (5%) at different stages of embryonic development: day 3, day 5. **Methods:** the present study examined 168 IVF/ICSI cycles from October 2019 to February 2021 at the Assisted Reproductive Center, 16A Ha Dong General Hospital. Embryos were randomly assigned to 2 groups: group 1 used a K-system G-210 tri-gas incubator (Australia) (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) while group 2 used a Thermo Scientific 371 dual-gas incubator (Denmark) (5% CO₂, 75% N₂ with 20% atmospheric Oxygen concentration). Participants in the study were patients younger than 37 years old, with AMH>1.2 ng/ml, and AFC≥4. Mature oocytes were injected with sperm, and cultured in a sequential medium (G1,G2-PLUS™). Embryologists assessed embryos on the day of fertilisation, days 3, 5, and compared the results of the two groups, using the method of descriptive statistics and T-test. The results revealed an insignificant difference in fertilisation rate and the quality of cleavages cultured in these 2 groups (percentages of good- and average quality cleavages were, in turn, 77.28±4.62% và 77.99±5.03%, at p>0.05, number of poor quality cleavages were, in turn, 1.71±0.38 vs 1.97±0.49 with p>0.05). The results on day 5 embryo showed that the percentage of blastocysts (from fertilisation) and the percentage of morphologically good- and average-quality blastocysts tended to increase higher when cultured in 5% oxygen concentration (p<0.05) compared with the 20% one (57.79±3.60% and 53.05±4.50%, 78.62±4.42% and 70.97±5.67%, respectively). **Conclusions:** embryo cultured in a low oxygen concentration helps embryos develop better on day 5 than when cultured at atmospheric concentrations.

Keywords: culture blastocyst, culture medium, IVF, low oxygen concentration.

Classification number: 3.5

Scientific model 371 (Đan Mạch). Các chu kỳ IVF/ICSI được thực hiện trong cùng một phòng Lab với cùng quy trình lâm sàng, quy trình phòng thí nghiệm và vật liệu tiếp xúc. Không có sự thay đổi nhân viên phòng thí nghiệm phôi học, thay đổi duy nhất là thay đổi về môi trường nuôi cấy: sử dụng môi trường nuôi cấy đa bước G-1, G-2 plus của hãng Vitrolife-Thụy Điển, các chu kỳ IVF được sử dụng ngẫu nhiên 2 loại môi trường này trong suốt giai đoạn nghiên cứu. Đã có sự chấp thuận của Hội đồng quản trị Trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện 16A Hà Đông, dữ liệu được thu thập từ hồ sơ bệnh án của Trung tâm. Nghiên cứu lựa chọn những bệnh nhân có ít nhất 4 nang thứ cấp vào ngày 2 chu kỳ kinh, tuổi mẹ <37 tuổi và chỉ số AMH >1,2 ng/ml. Tổng số chu kỳ IVF/ICSI được đưa vào nghiên cứu là 168 với 1742 phôi ngày 1, được nuôi cấy trong môi trường đa bước G-1, G-2 plus trong 2 điều kiện oxy khác nhau theo Aafke và cs (2020) [5] và Sobrinho và cs (2011) [6].

Bệnh nhân sau khi được kích thích buồng trứng có kiểm soát 9-12 ngày, sau 36 giờ tiêm rụng, bệnh nhân được hút nang qua hướng dẫn siêu âm. Nang trứng được lấy ra và chuyển vào phòng thụ tinh ống nghiệm trong 2 phút, đặt trong tủ âm 2-4 giờ để chuẩn bị cho chu kỳ ICSI.

Sau ICSI, tất cả noãn được đặt vào môi trường rửa (có chứa 10% chất thay thế huyết thanh tổng hợp trong 25 vi giọt và được phân chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm trong tủ nuôi cấy theo nồng độ oxy thấp K-system G-210 (Úc) hoặc tủ nuôi cấy nồng độ oxy khí quyển Thermo Scientific model 371 (Đan Mạch). Mỗi loại tủ được kiểm soát pH bằng cách điều chỉnh nồng độ CO₂ (chuẩn độ ở mức 5,0-6,5%), tất cả các phôi đều trải qua phân loại chất lượng tiêu chuẩn của ngày 3 để đánh giá số lượng tế bào, tính đối xứng, sự phân mảnh và chỉ định ở mức độ loại 1, 2, 3 theo phương pháp của đồng thuận Istanbul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine (2011) [7]. Đến ngày 5, phôi được đánh giá thêm một lần nữa dựa vào các tiêu chí: độ giãn nở của khoang phôi nang, thể tích ICM, thể tích lá nuôi (theo các mức độ: tốt, trung bình và xấu) theo phương pháp của đồng thuận Istanbul [7] kết hợp với so sánh các nhóm phát triển phôi bằng phương pháp phân tích mô tả sử dụng kiểm định T-test.

Quy trình nghiên cứu được thực hiện như sau:

- Thu thập, lựa chọn bệnh nhân
- Tiêm thuốc kích trứng
- Tiêm rụng
- Chọc trứng
- Tách trứng

Phân chia thành 2 nhóm: nhóm nuôi ở nồng độ oxy thấp 5% và nhóm nuôi ở nồng độ oxy 20%. Sau đó tiến hành:

- Đánh giá hình thái phôi ngày 3
- Đánh giá hình thái phôi ngày 5
- Thu thập số liệu và xử lý kết quả

Kết quả

Trong thời gian 1,5 năm (tháng 10/2019 - tháng 2/2021), có 168 chu kỳ IVF được thực hiện với ít nhất một trứng được thụ tinh. Trong đó, 95 chu kỳ có phôi được nuôi cấy trong tủ nuôi cấy có hàm lượng oxy thấp và 73 chu kỳ có phôi được nuôi cấy trong tủ có nồng độ oxy khí quyển. Trong các chu kỳ IVF/ICSI, chỉ số AMH, số noãn và số phôi ngày 1 của nhóm nuôi cấy 20% oxy cao hơn so với nhóm oxy 5% nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$); ngược lại, tỷ lệ thụ tinh của nhóm oxy 5% cao hơn so với nhóm 20% nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p>0,15$), mặc dù không có sự khác biệt về tuổi ở cả 2 nhóm nghiên cứu (bảng 1).

Bảng 1. Thông tin cơ bản của bệnh nhân.

Đặc điểm	Nhóm nuôi cấy 5% oxy	Nhóm nuôi cấy 20% oxy	Giá trị t
Số lượng bệnh nhân	95	73	
Tuổi	31,20±0,92	31,45±1,01	0,3669 ($p=[0,25-0,5]$)
AMH (mg/ml)	3,52±0,56	3,99±0,73	1,0162 ($p=[0,15-0,2]$)
Số noãn/chu kỳ	11,93±1,12	13,45±1,63	1,5382 ($p=[0,05-0,1]$)
Tỷ lệ thụ tinh (%)	81,11±2,85	78,82±3,33	1,0394 ($p=[0,15-0,2]$)
Tổng số phôi ngày 1	931	811	
Số phôi/chu kỳ	9,80±0,98	11,11±1,50	1,4553 ($p=[0,05-0,1]$)

Bảng 2 cho thấy, không có sự khác biệt nào đáng kể trong sự phát triển của phôi giai đoạn phôi dâu (phôi ngày 3): chất lượng phôi ngày 3 của cả 2 nhóm chủ yếu là phôi loại tốt và trung bình. Số lượng phôi trung bình chiếm tỷ lệ cao nhất ở cả 2 nhóm. Sự khác biệt của các loại phôi giữa 2 nhóm nghiên cứu không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Tuy nhiên các kết quả cho thấy, khi sử dụng tủ nuôi cấy có nồng độ oxy thấp, số lượng phôi ngày 3 mỗi chu kỳ thấp hơn, không có ý nghĩa thống kê so với khi nuôi phôi bằng nồng độ oxy khí quyển (8,31±0,87 so với 9,26±1,32 với $p>0,1$).

Bảng 2. So sánh đặc điểm phôi ngày 3 giữa 2 nhóm nghiên cứu.

Đặc điểm	5% oxy	20% oxy	Giá trị t
Tổng số phôi	789	676	
Tỷ lệ phôi N3 (%)	84,96±2,77	84,09±2,15	0,4913 ($p=[0,25-0,5]$)
Số lượng phôi mỗi chu kỳ	8,31±0,87	9,26±1,32	1,2046 ($p=[0,10-0,15]$)
Số lượng phôi tốt	179	179	
Số lượng phôi tốt mỗi chu kỳ	1,88±0,47	2,45±0,64	1,4198 ($p=[0,05-0,1]$)
Tỷ lệ phôi tốt (%)	21,47±4,25	23,37±4,47	0,6142 ($p=[0,25-0,5]$)
Số lượng phôi loại trung bình	448	353	
Số lượng phôi loại trung bình mỗi chu kỳ	4,72±0,62	4,84±0,77	0,2418 ($p=[0,25-0,5]$)
Tỷ lệ phôi trung bình (%)	55,81±5,17	54,62±5,34	0,3190 ($p=[0,25-0,5]$)
Tỷ lệ phôi tốt và trung bình (%)	77,28±4,62	77,99±5,03	0,2074 ($p=[0,25-0,5]$)
Số lượng phôi xấu	162	144	
Phôi xấu/chu kỳ	1,71±0,38	1,97±0,49	0,8588 ($p=[0,15-0,2]$)
Tỷ lệ phôi xấu (%)	22,72±4,62	22,01±5,03	0,2074 ($p=[0,25-0,5]$)

Bảng 3. So sánh đặc điểm phôi ngày 5 giữa 2 nhóm nghiên cứu.

Đặc điểm	5% oxy	20% oxy	Giá trị t
Tổng số phôi	534	430	
Tỷ lệ phôi N5 (%)	57,79±3,60	53,05±4,50	1,6362 ($p=[0,05-0,1]$)
Số lượng phôi N5 mỗi chu kỳ	5,62±0,66	5,89±0,94	0,4660 ($p=[0,25-0,5]$)
Tỷ lệ phôi ngày 5 so với ngày 3 (%)	68,20±3,74	63,34±5,31	1,4877 ($p=[0,05-0,1]$)
Tổng số lượng phôi tốt	292	219	
Số lượng phôi tốt mỗi chu kỳ	3,07±0,52	3,00±0,65	0,1764 ($p=[0,25-0,5]$)
Tỷ lệ loại tốt (%)	51,68±6,13	48,76±7,11	0,6179 ($p=[0,25-0,5]$)
Tổng số lượng phôi trung bình	133	101	
Số lượng phôi trung bình mỗi chu kỳ	1,40±0,29	1,38±0,38	0,0683 ($p=[0,25-0,5]$)
Tỷ lệ loại trung bình (%)	26,95±5,35	22,21±5,98	1,1755 ($p=[0,1-0,15]$)
Tỷ lệ loại tốt và trung bình (%)	78,62±4,42	70,97±5,67	2,1195 ($p=[0,01-0,025]$)
Tổng số lượng phôi xấu	109	110	
Số lượng phôi xấu mỗi chu kỳ	1,15±0,21	1,51±0,25	2,1879 ($p=[0,01-0,025]$)
Tỷ lệ loại xấu (%)	21,38±4,42	29,03±5,67	2,1195 ($p=[0,01-0,025]$)

Bảng 3 cho thấy, chất lượng phôi ngày 5 của cả 2 nhóm chủ yếu là phôi loại tốt. Tỷ lệ phôi loại tốt và trung bình khi nuôi cấy trong môi trường oxy 5% cao hơn so với trong môi trường 20% oxy (78,62±4,42 so với 70,97±5,67, $p<0,025$). Số lượng phôi xấu của nhóm oxy 20% cao hơn so với nhóm phôi nuôi cấy trong nồng độ oxy thấp (1,51±0,25 so với 1,15±0,21 với $p<0,025$). Như vậy, chất lượng phôi ngày 5 ở nhóm oxy 5% tốt hơn so với nhóm oxy 20%, mặc dù chất lượng phôi ngày 3 ở 2 nhóm nghiên cứu không có sự khác biệt. Tỷ lệ phôi phát triển từ ngày 3 lên ngày 5 và từ ngày 1 lên ngày 5 lớn hơn khi được nuôi cấy bằng nồng độ oxy 5% so với nồng độ oxy 20%, dù không có ý nghĩa thống kê ($0,05<p<0,1$).

Bàn luận

Trong nghiên cứu này, số lượng bệnh nhân, tuổi, chỉ số nội tiết AMH là tương tự nhau ở cả 2 nhóm; vì vậy, có thể so sánh khách quan giữa 2 nhóm môi trường. Kết quả cho thấy khi nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 5% cho tỷ lệ thụ tinh, số lượng phôi, chất lượng hình thái phôi của ngày 3 tương đương với nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 20%. Tuy nhiên, nuôi cấy phôi ở 2 nồng độ oxy 5 và 20% có ảnh hưởng đến tiềm năng phát triển tiếp theo của phôi hay không và có ảnh hưởng đến kết cục có thai lâm sàng hay không khi chuyển phôi giai đoạn phân chia sớm thì cần có những nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả của chúng tôi tương tự kết quả nghiên cứu của David và cs (2011) [8], khi nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy thấp cho tỷ lệ hình thành phôi nang cao hơn, có ý nghĩa thống kê so với nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy trong không khí. Tỷ lệ hình thành phôi nang trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn một số nghiên cứu khác, có thể do chúng tôi đã lựa chọn các phôi có chất lượng.

Trên thực tế, trong điều kiện cơ thể, noãn và phôi ở giai

đoạn phân chia sớm được phát triển trong vôi tử cung ở nồng độ oxy 2-5%. Như vậy, việc hạ thấp nồng độ oxy trong điều kiện nuôi cấy phôi xuống dưới 5% có thể thích hợp cho sự thụ tinh và phát triển của phôi ở giai đoạn phôi phân chia sớm.

Trong nghiên cứu này, đánh giá chung nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy thấp tốt cho sự thụ tinh và phát triển của phôi giai đoạn phân chia, số lượng phôi và chất lượng phôi cao hơn so với nhóm nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 20%. Đối với sự phát triển của phôi ngày 3, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, nhưng có ý nghĩa thống kê đối với phôi ngày 5 về số lượng phôi và chất lượng phôi cao hơn so với nhóm nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 20%, các kết quả phù hợp với các tác giả Sobrinho và cs (2011) [6], Ciray và cs (2009) [9], Nguyễn Khang Sơn và cs (2020) [10]. Trong nghiên cứu mới đây của Menken và cs (2017) [11] khi so sánh nuôi cấy phôi từ giai đoạn thụ tinh ngày 1 đến giai đoạn phôi nang ngày 5, ngày 6 ở nồng độ oxy 3,5% so với nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 5%, tác giả nhận thấy tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ phôi giai đoạn phân chia ở nhóm nuôi cấy nồng độ oxy 2-3,5% cao hơn, có ý nghĩa thống kê so với nhóm nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 5% hoặc 20% [11].

Kết luận

Nghiên cứu so sánh ngẫu nhiên 1742 phôi từ 168 chu kỳ, được chia đều thành 2 nhóm nuôi cấy trong 2 tủ nuôi cấy 3 khí K-system G-210 (Úc) và tủ nuôi cấy 2 khí Thermo Scientific model 371 (Đan Mạch). Kết quả cho thấy, không có sự khác biệt nhiều về chất lượng phôi ngày 3, nhưng nhìn chung nồng độ oxy 5% đã nuôi cấy được phôi nang lên ngày 5 phát triển tốt hơn trên phương diện hình thái.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.W. Catt, M. Henman (2000), "Toxic effects of oxygen on human embryo development", *Hum. Reprod.*, **15**(suppl. 2), pp.199-206.
- [2] B. Fischer, B.D. Bavister (1993), "Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits", *J. Reprod. Fertil.*, **99**, pp.673-679.
- [3] Y. Yang, et al. (2016), "Comparison of 2, 5, and 20% O₂ on the development of post-thaw", *J. Assist. Reprod. Genet.*, **33**(7), pp.919-927.
- [4] N. Guo, et al. (2014), "Two different concentrations of oxygen for culturing precompaction stage embryos on human embryo development competence: a prospective randomized sibling-oocyte study", *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **9**, pp.6191-6198.
- [5] P.A.V.M. Aafke, et al. (2020), "Reduced oxygen concentration during human IVF culture improves embryo utilization and cumulative pregnancy rates per cycle", *Human Reproduction Open*, **2020**(1), DOI: 10.1093/hropen/hoz036.
- [6] D.B.G. Sobrinho, et al. (2011), "IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis", *Reproductive Biology and Endocrinology*, **9**, DOI: 10.1186/1477-7827-9-143.
- [7] Alpha Scientists in Reproductive Medicine (2011), "The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting", *Hum. Reprod.*, **26**(6), pp.1270-1283.
- [8] G.K. David, et al. (2011), *Human Assisted Reproductive Technology - Future Trends in Laboratory and Clinical Practice*, Cambridge University Press, New York, USA.
- [9] H.N. Ciray, et al (2009), "In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes", *Fertil. Steril.*, **91**(4), pp.1459-1461.
- [10] Nguyễn Khang Sơn, Lê Ngọc Dung, Nguyễn Thanh Hoa, Nguyễn Thị Thúy, Nguyễn Hương Giang (2020), "Mối tương quan giữa các đặc điểm hình thái của phôi đông lạnh ngày thứ 2 và tiềm năng phát triển phôi bào", *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **133**(9), tr.10-18.
- [11] J. Menken, et al. (2017), "Impact of 3.5% O₂ culture on embryo development and clinical outcomes: a comparative study", **108**(4), pp.635-641.