

**NGHIÊN CỨU THỬ NGHIỆM BƯỚC ĐẦU:
ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI ĐIỂM HỖ TRỢ PHÔI THOÁT MÀNG BẰNG LASER
TỚI KẾT QUẢ THỤ TINH ỒNG NGHIỆM CỦA CHUYỂN PHÔI TRỮ NGÀY 3**

*Nguyễn Thị Liên Hương¹, Trần Mai Hương¹
An Mạnh Cường¹, Vũ Đình Hợp¹, Lê Hoàng¹*

Tóm tắt

Mục tiêu: So sánh tỷ lệ có thai và tỷ lệ phôi tốt của phôi rã đông ngày 3 nuôi qua đêm và được thực hiện kỹ thuật hỗ trợ phôi thoát màng (assisted hatching - AH) ở hai thời điểm: Tiến hành ngay sau rã đông và ngay trước chuyển phôi. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên tại Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh, từ tháng 10/2020 - 10/2021, trên 154 bệnh nhân (BN) có chu kỳ chuyển phôi trữ ngày 3, phân bố ngẫu nhiên vào hai nhóm: Nhóm AH trước (AH ngay sau rã đông) và nhóm AH sau (AH sau khi nuôi qua đêm, ngay trước chuyển phôi). **Kết quả:** Tỷ lệ có thai ở nhóm chuyển phôi trữ ngày 3 của nhóm AH trước và AH sau lần lượt là 61% và 58,4%, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tỷ lệ phôi tốt (độ I và II) của nhóm AH trước và nhóm AH sau lần lượt là 79,2% và 83,8%, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). **Kết luận:** Thời điểm hỗ trợ phôi thoát màng ngày 3 rã đông không ảnh hưởng tới tỷ lệ có thai và tỷ lệ phôi tốt khi nuôi qua đêm.

* *Từ khoá:* Hỗ trợ phôi thoát màng; Chuyển phôi trữ; Kết quả có thai.

**A PILOT STUDY: THE IMPACT OF LASER-ASSISTED HATCHING
TIMING ON THE CLINICAL OUTCOME OF DAY 3 THAWED
EMBRYO TRANSFER**

Summary

Objectives: To compare the pregnancy rate and the good embryo rate on day 3 thawed embryo, cultured overnight and performed assisted hatching (assisted hatching - AH) at two-time points: Immediately after thawing and before embryo transfer. **Subjects and methods:** Randomized clinical trial study at Tam Anh Hospital,

¹Trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh

Người phản hồi: Lê Hoàng (lehoang@tamanhhospital.vn)

Ngày nhận bài: 25/02/2022

Ngày được chấp nhận đăng: 01/3/2022

from October 2020 to October 2021, on 154 cycles of embryo transfer on day 3, randomly distributed into two groups: group “AH before” (AH immediately after thawing) and group “AH after” (AH after overnight culture, just before embryo transfer). **Results:** The pregnancy rate in the group “AH before” and “AH after” was 61% and 58.4%, respectively, the difference was not statistically significant ($p > 0.05$). The percentage of good embryos (Grade I and II) of the group AH before and group AH after were 79.2% and 83.8%, respectively, the difference was not statistically significant ($p > 0.05$). **Conclusion:** The time to perform assisted hatching of day 3 frozen-thawed embryos might not affect the pregnancy rate and the good embryo rate when cultured overnight.

* *Keywords:* Assisted hatching; Frozen embryo transfer; Clinical outcome.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, tần suất chuyển phôi trữ (FET) tăng mạnh đòi hỏi phải có một quy trình trữ, rã đông an toàn và hiệu quả. Việc rã đông phôi ngày 3, nuôi cấy qua đêm ở các chu kỳ FET mang lại kết quả lâm sàng tốt hơn so với thời gian nuôi cấy ngắn [1]. Tuy nhiên, màng trong suốt của phôi trữ thường có xu hướng bị cứng lại, cản trở phôi thoát màng, giảm khả năng làm tổ [2]. Do đó AH ra đời, được ứng dụng để làm mỏng hoặc tạo một lỗ thủng trên màng trong suốt của phôi, qua đó tạo điều kiện cho phôi thoát màng. Hiệu quả của kỹ thuật AH trên các chu kỳ chuyển phôi trữ đã được chứng minh làm tăng rõ rệt tỷ lệ làm tổ, tỷ lệ có thai [3].

Thời điểm AH rất đa dạng và tùy thuộc vào quy trình và mục đích AH của từng trung tâm. Hiện nay hai chiến lược AH cho phôi rã đông ngày 3 nuôi qua đêm được áp dụng phổ biến tại các

trung tâm IVF: AH ngay sau rã đông hoặc AH ngay trước chuyển phôi. AH ngay sau rã đông là phôi được rã đông, thực hiện AH, nuôi qua đêm để chuyển phôi. AH ngay trước chuyển phôi là phôi rã đông xong được nuôi qua đêm, rồi thực hiện AH trước chuyển phôi từ 1,5 - 3 giờ. Việc nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của thời điểm AH phôi sau rã đông tới kết quả lâm sàng còn hạn chế. Hiện nay, chưa tìm thấy nghiên cứu nào đầy đủ và có hệ thống đến các trường hợp phôi ngày 3 rã đông nuôi cấy qua đêm để chuyển phôi, chưa có qui trình hay khuyến cáo nào về thời điểm AH cho trường hợp này. Vì vậy, nghiên cứu của chúng tôi được tiến hành nhằm: *So sánh tỷ lệ phôi tốt của phôi rã đông ngày 3 nuôi qua đêm, thực hiện AH ở hai thời điểm trên và so sánh tỷ lệ có thai giữa hai nhóm chuyển phôi trữ ngày 3 mà phôi rã đông nuôi qua đêm được AH ở hai thời điểm: AH ngay sau rã đông và AH ngay trước chuyển phôi.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

154 BN có chỉ định chuyển phôi trữ ngày 3, được chuẩn bị nội mạc tử cung và hỗ trợ hoàng thể bằng cách sử dụng nội tiết ngoại sinh, phối hợp cùng estradiol đường uống và progesterone đường âm đạo tại Trung tâm Hỗ trợ Sinh sản - Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh, Hà Nội từ tháng 10/2020 - 10/2021.

* *Tiêu chuẩn lựa chọn*: BN có tuổi ≤ 38 ; độ dày niêm mạc tử cung 8 - 12 mm; số lần chuyển phôi thất bại có thai < 3 lần; tiền sử sảy/lưu thai ≤ 2 lần; có 2 phôi sau rã có chất lượng từ tốt trở lên; chuyển 2 phôi; chuyển phôi dễ.

* *Tiêu chuẩn loại trừ*: Xin cho noãn/phôi.

2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên, so sánh ảnh hưởng của thời điểm AH của chuyển phôi trữ ngày 3, phân bố ngẫu nhiên vào hai nhóm can thiệp:

- Nhóm AH sau: Phôi ngày 3 rã đông được nuôi qua đêm, ngày 4 chuyển phôi, AH trước chuyển phôi ít nhất 30 phút.

- Nhóm AH trước: Phôi ngày 3 rã đông được AH ngay, nuôi qua đêm, ngày 4 chuyển phôi.

Kết quả chính là thai lâm sàng. Cỡ mẫu được tính theo công thức tính cỡ mẫu cho một nghiên cứu có so sánh 2 tỷ lệ [4]. Tỷ lệ có thai của nhóm AH sau,

ước tính là 0,71% (theo D. Hui và CS [1]); tỷ lệ có thai của nhóm AH trước, ước tính là 0,47% (theo V. Holschbach và CS [5]). Như vậy, số BN cần thiết trong mỗi nhóm với $\alpha = 0,05$ và $\beta = 0,20$ (power = 80%) là 77 người.

* *Phương pháp tiến hành*:

- Chuẩn bị hồ sơ các BN có chỉ định rã đông 2 phôi ngày 3 để chuyển, áp dụng các tiêu chuẩn lựa chọn. BN không đủ điều kiện sẽ bị loại ra khỏi nghiên cứu.

- Rã đông phôi được thực hiện theo quy trình rã đông phôi tại Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh.

- Phôi được rã sẽ được đánh giá chất lượng sau rã đông theo tiêu chuẩn 4 độ tại Lab IVF Tâm Anh. Các trường hợp được chọn sẽ phân bố ngẫu nhiên vào hai nhóm phôi thực hiện kỹ thuật AH tại hai thời điểm khác nhau.

- Tiến hành kỹ thuật AH trên phôi rã đông ngày 3, hai chuyên viên phôi thực hiện trước chuyển phôi (khoảng 30 phút), hoặc thực hiện ngay sau rã đông, sử dụng phương pháp laser. Màng trong suốt được bắn thủng bằng laser một lỗ có đường kính khoảng 30 μm . Vị trí bắn là nơi có khoang quang phôi - PVS rộng hoặc là nơi có nhiều mảnh vỡ. Phôi sau khi thực hiện kỹ thuật AH sẽ được chuyển giọt môi trường để nuôi cấy tiếp hoặc chuyển phôi.

- Phôi ngày 4 được đánh giá trước chuyển theo tiêu chuẩn 4 độ.

- Chuyển phôi: Chuyên viên phôi tiến hành nạp phôi vào catheter và đưa catheter chứa phôi cho bác sĩ lâm sàng, trường hợp không đủ 2 phôi chuyển sẽ bị loại khỏi nghiên cứu.

- Theo dõi kết quả có thai của BN: Định lượng β hCG 14 ngày sau chuyển phôi. Nếu có thai thì siêu âm xác định túi thai 4 tuần sau chuyển phôi. Xác định số túi thai và sự hoạt động của tim thai.

* Các tiêu chuẩn đánh giá phôi trong nghiên cứu:

- Đánh giá phôi ngày 3: Đánh giá phôi ngày 3 dựa theo các tiêu chuẩn đánh giá của Laura Rienzi, có cải tiến [6]. Trong đó, phôi tốt (độ I và II) được đánh giá khi phôi có 8 tế bào đều nhau, phôi bào nén chặt, phôi bào đang nén tỷ lệ mảnh vỡ < 10%; hoặc phôi có từ 6 - 16 phôi bào, hoặc phôi bào đã nén, đang nén một phần, tỷ lệ mảnh vỡ 10 - 25%.

- Đánh giá phôi ngày 4 (đánh giá trước chuyển): Được chia làm 4 độ theo tiêu chuẩn đánh giá của Deanne Feil [7]. Phôi được đánh giá là tốt (phôi độ I và độ II) khi thoả mãn các tiêu chí sau: Phôi cavitating (phôi đang tạo khoang), phôi bào nén chặt, tỷ lệ mảnh vỡ < 10%; hoặc phôi bào nén chặt, phôi bào đang nén, phôi có nhiều hơn 8 tế bào hoặc có ít nhất 3 phôi bào phân chia tiếp, kèm với 1 trong các bất thường sau: Tỷ lệ mảnh vỡ > 10%, bất thường về phân chia tế bào, phôi mới chỉ có nén lại một phần, tỷ lệ phôi bào thoái hoá < 25%.

- Đánh giá phôi sau rã đông: Dựa vào sự phân độ phôi ở hai giai đoạn như ở trên đối với phôi sau rã đông còn nguyên vẹn. Các phôi thoái hóa được đánh giá dựa vào phần trăm thoái hoá: Thoái hóa độ 1: Thoái hóa < 25%; Thoái hóa độ 2: Thoái hóa 25 - 50%; Thoái hóa độ 3: Thoái hóa > 50%; Thoái hóa độ 4: Thoái hóa hoàn toàn.

* Phương pháp xử lý số liệu:

Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS ver 26.0. Các biến định lượng được so sánh bằng phép kiểm Mann-Whitney U-test hoặc T-test. Mối liên quan giữa các biến định tính được phân tích bằng test Chi-square hoặc Fisher's exact test. Các biến được mô tả bằng trung vị (IQR) hoặc số lượng (%). Các yếu tố có liên quan đến thai lâm sàng được đưa vào mô hình hồi quy đa biến.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm chung của BN trong nhóm nghiên cứu

Từ tháng 10/2020 - 10/2021, tại Trung tâm Hỗ trợ Sinh sản, Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh, Hà Nội, chúng tôi đã tiến hành thu thập số liệu của 154 BN có chỉ định chuyển phôi trữ ngày 3 đủ các tiêu chuẩn đưa vào đối tượng nghiên cứu. Đối tượng nghiên cứu được chia thành hai nhóm: Nhóm AH sau gồm 77 BN chuyển phôi trữ ngày 3 được nuôi qua đêm rồi mới AH, nhóm AH trước gồm 77 BN chuyển phôi trữ ngày 3 được AH ngay sau rã rồi nuôi qua đêm.

Bảng 1: Đặc điểm chung của BN tham gia nghiên cứu.

Chỉ tiêu	Nhóm AH sau	Nhóm AH trước	p
Tuổi	30,94 ± 4,25	30,29 ± 4,11	0,337
Chỉ số BMI	20,70 (19 - 22)	21,3 (19,5 - 22,83)	0,15
Thời gian vô sinh	3 (2 - 5)	3,5 (2,25 - 6)	0,382
Loại vô sinh (n = 77); % (n)			
Nguyên phát	70,1 (54)	88,3 (68)	0,005
Thứ phát	29,9 (23)	11,7 (9)	
Nguyên nhân vô sinh (n = 77); % (n)			
Do vợ	55,8 (43)	53,2 (41)	0,457
Do chồng	13 (10)	6,5 (5)	
Do hai vợ chồng	9,1 (7)	11,7 (9)	
Không rõ nguyên nhân	22,1 (17)	28,6 (22)	
Số lần chuyển phôi (n = 77); % (n)			
0 lần	48,1 (37)	46,8 (36)	0,974
1 lần	36,4 (28)	36,4 (28)	
2 lần	15,5 (12)	16,8 (13)	
Số lần sảy thai (n = 77); % (n)			
0 lần	67,53 (52)	75,32 (58)	0,546
1 lần	23,37 (18)	16,88 (13)	
2 lần	9,10 (7)	7,80 (6)	
Trung bình độ dày NMTC (mm)	9,42 ± 1,07	9,69 ± 1,03	0,108

Các đặc điểm phân bố ở hai nhóm nghiên cứu là tương đồng nhau. Nhóm AH trước có tỷ lệ vô sinh nguyên phát là 88,3%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm AH sau.

2. So sánh tỷ lệ phôi tốt khi nuôi qua đêm giữa hai nhóm thời điểm AH

Bảng 2: Đặc điểm phôi sau khi nuôi qua đêm giữa hai nhóm nghiên cứu.

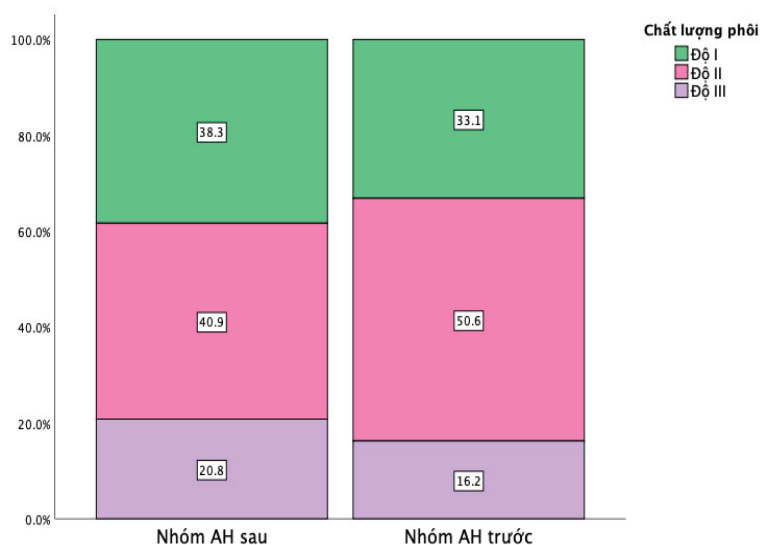
	Nhóm AH sau (n = 154); % (n)	Nhóm AH trước (n = 154); % (n)	P
Tỷ lệ phôi tốt (độ I và II)	79,2 (122)	83,8 (129)	0,304
Tỷ lệ phôi có dấu hiệu nén	81,2 (125)	88,3 (136)	0,081
Tỷ lệ phôi nén hoàn toàn	38,3 (59)	33,1 (51)	0,341

Tỷ lệ phôi tốt sau khi nuôi qua đêm, tỷ lệ phôi có dấu hiệu nén và tỷ lệ phôi nén hoàn toàn là tương đương nhau ở cả hai nhóm thời điểm AH.

3. So sánh kết quả có thai của hai nhóm thời điểm AH

* Đặc điểm phôi chuyển giữa hai nhóm nghiên cứu:

Đặc điểm của phôi chuyển ở hai nhóm thời điểm AH khác nhau được thể hiện trong biểu đồ 1.



Biểu đồ 1: So sánh chất lượng phôi chuyển ở hai nhóm thời điểm AH.

Chất lượng phôi chuyển: Phôi độ II chiếm tỷ lệ lớn nhất ở cả hai nhóm. Tỷ lệ phôi chuyển độ II ở nhóm AH sau là 40,9%, ở nhóm AH trước là 50,6%. Phôi chuyển độ I ở nhóm AH sau chiếm 38,3%, ở nhóm AH trước chiếm 33,1%. Tỷ lệ phôi độ I, độ II, độ III ở cả hai nhóm thời điểm AH khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,219$.

* So sánh kết quả có thai giữa hai nhóm thời điểm AH:

Bảng 3: So sánh kết quả có thai giữa hai nhóm nghiên cứu.

Kết quả thai	Nhóm AH sau % (n)	Nhóm AH trước % (n)	p
Thai lâm sàng	58,4 (45/77)	61 (47/77)	0,742
Tỷ lệ β hCG (+)	63,6 (49/77)	64,9 (50/77)	0,866
Tỷ lệ làm tổ	39,61 (61/154)	44,16 (68/154)	0,506
Thai diễn tiến	53,4 (39/73)	56,8 (42/74)	0,685
Tỷ lệ thai sinh hóa	5,2 (4/77)	3,9 (3/77)	0,7

Tỷ lệ thai lâm sàng ở nhóm AH trước có xu hướng cao hơn so với nhóm AH sau (lần lượt là 61% và 58,4%), tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Tỷ lệ β hCG (+), tỷ lệ làm tổ, tỷ lệ thai diễn tiến, tỷ lệ thai sinh hóa của hai nhóm thời điểm AH khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

* Các yếu tố ảnh hưởng tới kết quả có thai lâm sàng:

Bảng 4: Phân tích hồi quy đa biến các yếu tố ảnh hưởng tới kết cục thai lâm sàng.

Các chỉ tiêu	Tỷ lệ thai lâm sàng (%)	OR hiệu chỉnh	95% CI	p
Chỉ số BMI				
BMI < 18,5	60	3,945	0,250 - 62,260	0,329
18,5 ≤ BMI < 25	59,9	5,535	0,471 - 65,090	0,174
BMI ≥ 25	57,1			
Loại vô sinh				
Nguyên phát	62,3	1,225	0,489 - 3,065	0,665
Thứ phát	50			
Nguyên nhân vô sinh				
Do vợ	51,2	0,582	0,246 - 1,378	0,218
Do chồng	66,7	0,917	0,238 - 3,530	0,899
Do vợ chồng	81,3	1,952	0,449 - 8,492	0,273
Không rõ nguyên nhân	66,7			

Các chỉ tiêu	Tỷ lệ thai lâm sàng (%)	OR hiệu chỉnh	95% CI	p
Số lần sảy thai				
0 lần	63,6	2,349	0,628 - 8,779	0,204
1 lần	17,4	1,440	0,337 - 6,133	0,624
2 lần	6,5			
Độ dày NMTC		1,057	0,747 - 1,495	0,754
Chất lượng 2 phôi chuyển	78,3	2,876	1,338 - 6,181	0,007
2 phôi tốt trở lên	21,7			
≥ 1 phôi trung bình				
Thời điểm AH				
AH trước	58,4	1,131	0,549 - 2,332	0,739
AH sau	61			

Kết quả phân tích đa biến cho thấy yếu tố thời điểm AH không ảnh hưởng tới kết quả có thai lâm sàng. Yếu tố chất lượng phôi ảnh hưởng tới kết quả có thai lâm sàng đáng kể nhất. Tỷ lệ phôi tốt cao làm tăng tỷ lệ thai lâm sàng lên 2,876 lần; KTC 1,338 - 6,181; p = 0,007.

BÀN LUẬN

1. Thời điểm hỗ trợ phôi thoát màng ảnh hưởng tới chất lượng phôi

Thực hiện kỹ thuật AH ngay sau khi rã đông rồi mới nuôi phôi ngày 3 qua đêm làm chất lượng phôi có xu hướng cải thiện (86,2% với 81,3%), tuy không có ý nghĩa thống kê. Nghiên cứu của Uppangla (2016) cũng cho thấy tỷ lệ phôi tốt khi nuôi qua đêm khác biệt không có ý nghĩa thống kê trên nhóm phôi trữ ngày 2 được AH ở

hai thời điểm khác nhau [8]. Điều này có thể được giải thích bởi việc tạo một lỗ nhỏ trên màng trong suốt của phôi có thể giúp cho các phôi bào hấp thụ một phần chất dinh dưỡng từ môi trường tốt hơn. Bên cạnh đó, nghiên cứu ở chuột cho thấy tốc độ phân chia phôi bào tăng khi phôi được thực hiện hỗ trợ thoát màng. Số lượng tế bào tăng lên đáng kể ở phôi ngày 3 đã được AH phát triển lên đến giai đoạn phôi nang và tăng tỷ lệ phôi bào trong khối

tế bào bên trong (inner cell mass) so với tổng số phôi bào [9]. Tuy nhiên, hình thái phôi kém đã được chứng minh thường có liên quan đến bất thường lệch bội nhiễm sắc thể, thay vì liên quan đến các vấn đề thoát màng. Do đó, theo nghiên cứu của chúng tôi, thời điểm thực hiện kỹ thuật AH có thể không có ích trong việc cải thiện chất lượng phôi ngày 3.

2. Thời điểm hỗ trợ phôi thoát màng ảnh hưởng tới kết quả có thai của chuyển phôi trữ ngày 3

Nghiên cứu thử nghiệm ban đầu cho thấy những phôi nhóm AH trước có xu hướng tăng tỷ lệ làm tổ, tỷ lệ có thai lâm sàng, thai diễn tiến và giảm tỷ lệ thai sinh hóa so với phôi nhóm AH sau (lần lượt là 45,38%, 64,6%, 56,9% và 1,5% với 39,06%, 57,8%, 53,1% và 6,3%). Tuy nhiên, khác biệt này không có ý nghĩa thống kê.

Nghiên cứu về thời điểm AH của Rubino (2020) cho thấy tỷ lệ thai lâm sàng, tỷ lệ trẻ sinh sống tăng đáng kể ở nhóm phôi được AH ở ngày 5 so với nhóm phôi được AH ở ngày 3 (lần lượt là 5,3% với 55,1%; 58,9% với 46,2%, $p < 0,001$) [10]. AH đã được chứng minh là phương pháp có thể cải thiện tỷ lệ làm tổ và mang thai đối với các trường hợp màng trong suốt bị cứng, ảnh hưởng tới khả năng thoát màng

của phôi như tuổi mẹ cao, chu kỳ chuyển phôi trữ lạnh. Các nghiên cứu so sánh kết quả ảnh hưởng của thời điểm tiến hành AH còn ít và gần như không có khuyến cáo về vấn đề này. Trong nghiên cứu này, chúng tôi không tìm thấy sự khác biệt về tỷ lệ có thai ở hai thời điểm AH phôi rã đông ngày 3 khi phôi được nuôi qua đêm.

Hạn chế chính của nghiên cứu này là mới tập trung chủ yếu vào các BN tiên lượng tốt trong chuyển phôi trữ ngày 3, nhằm đồng nhất đối tượng nghiên cứu nên có thể ở nhóm tiên lượng kém, kết quả sẽ khác biệt. Đối tượng nghiên cứu chưa có sự đồng nhất về tỷ lệ các loại vô sinh. Tuy nhiên, đây có thể coi là nghiên cứu thử nghiệm đầu tiên so sánh tỷ lệ có thai của chuyển phôi trữ ngày 3, được AH tại các thời điểm khác nhau. Tại Việt Nam, chúng tôi chưa tìm thấy nghiên cứu có hệ thống cho vấn đề này.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu trên 154 BN chuyển phôi trữ ngày 3 chưa tìm thấy sự khác biệt về chất lượng phôi khi phôi ngày 3 được AH tại hai thời điểm khác nhau. Đối với những phụ nữ có tiên lượng tốt, tỷ lệ có thai là tương đương nhau cho dù phôi rã đông ngày 3 được AH trước hay sau khi nuôi cấy qua đêm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hui D., Han X., Wang X., et al. (2020). Morula transfer achieves better clinical outcomes than post-thawed cleavage embryos after overnight culture in frozen embryo transfer (FET) cycles. *J Assist Reprod Genet*; 37(4):945-952.
2. Elnahas A., Elnahas T., Azmy O., et al. (2018). The use of laser assisted hatching of frozen/thawed embryos versus laser assisted hatching of fresh embryos in human intracytoplasmic sperm injection. *J Obstet Gynaecol*; 38(5):729.
3. Zeng M., Su S., and Li L. (2018). The effect of laser-assisted hatching on pregnancy outcomes of cryopreserved-thawed embryo transfer: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Lasers Med Sci*; 33(3):655-666.
4. Bonita, Ruth, Beaglehole, Robert, Kjellström, Tord & World Health Organization. (2006). *Basic epidemiology*, World Health Organization.
5. Holschbach V., Weigert J., Dietrich J.E., et al. (2017). Pregnancy rates of day 4 and day 5 embryos after culture in an integrated time-lapse incubator. *Reprod Biol Endocrinol*; 15.
6. Rienzi L., Ubaldi F., Iacobelli M., et al. (2005). Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reproductive BioMedicine Online*; 10(5):669-681.
7. Feil D., Henshaw R.C., and Lane M. (2008). Day 4 embryo selection is equal to Day 5 using a new embryo scoring system validated in single embryo transfers. *Human Reproduction*; 23(7):1505-1510.
8. Uppangala S., D'Souza F., Pudakalakatti S., et al. (2016). Laser assisted zona hatching does not lead to immediate impairment in human embryo quality and metabolism. *Syst Biol Reprod Med*; 62(6):396-403.
9. Iwasaki S., Yoshida N., Ushijima H., et al. (1990). Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *J Reprod Fertil*; 90(1):279-284.
10. Rubino P., Tapia L., Alonso R.R. de A., et al. (2020). Trophectoderm biopsy protocols can affect clinical outcomes: Time to focus on the blastocyst biopsy technique. *Fertility and Sterility*; 113(5):981-989.