

CHẤT LƯỢNG PHÔI CHUYỂN: YẾU TỐ TIÊN LƯỢNG KẾT QUẢ THỤ TINH TRONG ống NGHIỆM

Trương Thị Thanh Bình^(1,2), Bùi Thị Thu Hiền⁽¹⁾, Lê Thụy Hồng Khả^(1,2), Hồ Mạnh Tường^(1,2)
(1) Bệnh viện An Sinh, (2) Đại học Quốc gia - TP.HCM

Tóm tắt

Giới thiệu: Phương pháp đánh giá và lựa chọn phôi dựa trên đặc điểm hình thái được sử dụng phổ biến trong thụ tinh trong ống nghiệm (IVF). Đặc điểm về hình thái phôi có thể giúp tiên lượng khả năng có thai.

Mục tiêu: Xác định mối liên hệ giữa sự hiện diện của phôi tốt trong số phôi được chuyển và cơ hội có thai của bệnh nhân sau chuyển phôi giai đoạn phân chia.

Phương pháp: Nghiên cứu hồi cứu, thực hiện trên 1694 chu kỳ điều trị IVF có chuyển phôi vào ngày 2. Việc đánh giá phôi được thực hiện dựa trên tiêu chuẩn đồng thuận Istanbul năm 2010. Các ca điều trị được chia thành hai nhóm: nhóm 1 (n=1070) có ít nhất một phôi tốt trong số phôi được chuyển và nhóm 2 (n=624) không có phôi tốt được chuyển. Kết quả đánh giá bao gồm: tỉ lệ thai lâm sàng (CPR) và tỉ lệ thai diễn tiến (OR).

Kết quả: Tuổi vợ trung bình ở nhóm 1 và nhóm 2 lần lượt là $33,3 \pm 5,02$ and $33 \pm 5,1$ ($p=0,828$). Số phôi chuyển trung bình không có khác biệt giữa nhóm 1 và nhóm 2 ($2,89 \pm 1,11$ vs. $2,98 \pm 1,02$; $p=0,3$). CPR và OR của nhóm 1 cao hơn một cách có ý nghĩa so với nhóm 2 (42,1 vs. 20,7%; RR 2,04; 95% CI 1,91 – 2,17; $p=0,001$ và 37,5% vs. 15,5%; RR 2,41; 95% CI 2,27 – 2,55; $p=0,001$)

Kết luận: Chất lượng phôi chuyển vào ngày 2 có liên quan đến tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ thai diễn tiến ở bệnh nhân IVF. Sự hiện diện của phôi tốt trong số phôi được chuyển là một yếu tố tiên lượng rất có giá trị cho kết quả điều trị của bệnh nhân.

Abstract

QUALITY OF TRANSFERRED EMBRYOS AS PREDICTOR OF IVF OUTCOMES

Introduction: Morphology-based embryo scoring and selection are commonly used in IVF. Embryo morphology can have predictive value for pregnancy.

Objective: To investigate the association between morphology-based embryo quality and outcomes in an IVF program transferring early cleavage embryos.

Methods: This was a retrospective study of 1694 IVF cycles undergoing fresh embryo transfer on day 2. The 2010 Istanbul consensus for embryo scoring was applied. The studied cycles were divided into 2 groups: group 1 (n=1070) had at least 1 good embryo transferred; group 2 (n=624) with no good embryo transferred. Main outcomes were clinical pregnancy rate (CPR), ongoing pregnancy rate (OR).

Results: Mean age of women in group 1 and group 2 were 33.3 ± 5.0 and 33 ± 5.1 , respectively ($p=0.828$). Average number of embryos transferred were not significantly different between group 1 and group 2 (2.89 ± 1.11 vs. 2.98 ± 1.02 ; $p=0.3$). CPR and OR of group 1 were significantly higher than group 2 (42.1 vs. 20.7%, RR 2.04, 95% CI 1.91 – 2.17, $p=0.001$; and 37.5% vs. 15.5%, RR 2.41, 95% CI 2.27 – 2.55, $p=0.001$, respectively).

Conclusions: There was a strong relationship between quality of transferred embryo and IVF outcomes. Availability of good embryo for transfer is a good predictor for pregnancy outcomes.

1. Đặt vấn đề

Đa thai là một vấn đề gây nhiều tranh luận của thụ tinh trong ống nghiệm (IVF). Các trung tâm IVF phải chịu áp lực về tỉ lệ thành công nên thường chuyển nhiều phôi để tăng tỉ lệ thai. Chọn lựa phôi theo tiêu chuẩn hình thái là phương pháp phổ biến nhất, nhưng không chính xác. Mục tiêu của đánh giá và chọn lựa phôi nhằm chủ động giảm số lượng phôi chuyển ở những trường hợp tiên lượng khá và tốt để có thể quyết định số phôi chuyển vào tử cung phù hợp, giảm tỉ lệ đa thai mà vẫn duy trì được tỉ lệ thai cao và ổn định.

Bước đầu tiên cần thực hiện trong tiến trình này là cần phải nâng cao tính chính xác của việc đánh giá phôi nhằm chọn được phôi có tiềm năng làm tổ cao để chuyển vào buồng tử cung của người vợ. Đây là một thách thức lớn đối với các chuyên gia trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản. Bên cạnh đó, cần phải tiến hành những nghiên cứu sâu hơn về các yếu tố tiên lượng khả năng có thai sau IVF. Theo nhiều nghiên cứu, có rất nhiều yếu tố giúp tiên lượng khả năng có thai của bệnh nhân. Nhìn chung các yếu tố này được chia thành hai loại: yếu tố người vợ (tuổi vợ, số nang noãn, thời gian vô sinh, độ dày nội mạc tử

cung, nồng độ progesteron vào ngày tiêm hCG...) và yếu tố phôi học (tổng số phôi, số phôi tốt, số phôi chuyển, tỉ lệ thụ tinh...). Việc phân tích toàn bộ các yếu tố này cùng lúc có thể tìm ra một mô hình thích hợp, tuy nhiên việc này rất phức tạp, đòi hỏi nhiều thời gian, công sức để thu thập và phân tích các số liệu.

Tại trung tâm IVFAS, Bệnh viện An Sinh, việc đánh giá phôi được thực hiện theo đồng thuận của tổ chức Alpha (Hiệp hội các nhà phôi học thế giới) năm 2010[1]. Theo đó, phôi được phân thành 3 loại: phôi tốt, phôi trung bình và phôi xấu. Phôi tốt thường được ưu tiên để chuyển cho bệnh nhân. Tuy nhiên, hiện vẫn chưa rõ sự hiện diện của phôi tốt có ảnh hưởng đến khả năng có thai của bệnh nhân trong chu kỳ điều trị đó hay không. Ở Việt Nam, hiện tại, chưa có báo cáo nào thực hiện phân tích khả năng tiên lượng của chuyển phôi chất lượng tốt lên khả năng có thai sau chuyển phôi.

Chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu nhằm tìm hiểu mối tương quan giữa chuyển phôi chất lượng tốt và khả năng có thai trong chu kỳ điều trị. Đề tài khi hoàn thành sẽ xác định được mối liên hệ này đồng thời góp phần vào việc phân tích các yếu tố tiên lượng khả năng thành công của chu kỳ IVF, giúp cho các nhân viên y tế có thể tư vấn về hướng điều trị cho bệnh nhân, chọn lựa số phôi chuyển phù hợp, từ đó cải thiện tỉ lệ thành công và giảm tỉ lệ đa thai trong IVF.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu hồi cứu. Nghiên cứu được thực hiện trên 1694 chu kỳ phôi tươi có thực hiện chuyển phôi vào ngày 2 sau khi tiêm tinh trùng vào bào tương trứng. Các chu kỳ nghiên cứu được chia thành hai nhóm: nhóm 1 có ít nhất một phôi tốt và nhóm 2 không có phôi tốt trong số phôi được chuyển. So sánh tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ thai diễn tiến 2 nhóm.

Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân IVF được chuyển phôi tươi vào ngày 2 sau chọc hút tại Bệnh viện An Sinh.

Tiêu chuẩn nhận

– Tất cả các bệnh nhân điều trị vô sinh bằng phương pháp IVF có được chuyển phôi tươi vào ngày 2 sau khi thực hiện tiêm tinh trùng vào bào tương trứng (ICSI).

– Số phôi chuyển vào buồng tử cung tối đa 4 phôi.

Tiêu chuẩn loại

– Các chu kỳ nuôi trứng trưởng thành trong ống nghiệm

- Các chu kỳ xin trứng
- Các trường hợp đã thất bại từ 3 lần chuyển phôi trở lên trước đó

Các bước tiến hành

– Chọc hút trứng: chọc hút trứng tiến hành 36 giờ sau tiêm hCG.

– Quy trình tiêm tinh trùng vào trứng (ICSI) được thực hiện 3 – 4 giờ sau chọc hút.

– Sau 16 – 18 giờ kể từ khi ICSI, tiến hành kiểm tra thụ tinh.

– Việc đánh giá phôi được thực hiện tại thời điểm 44h ±1 sau ICSI, theo tiêu chuẩn của đồng thuận Alpha năm 2010[1].

– Trước khi chuyển phôi, tất cả các phôi được chọn để chuyển được hỗ trợ thoát màng bằng laser.

– Thử thai và theo dõi thai

Các yếu tố đánh giá kết quả điều trị: bao gồm tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ thai diễn tiến.

Tỉ lệ thai lâm sàng (clinical pregnancy rate) được tính bằng tỉ lệ phần trăm các trường hợp có thai lâm sàng trên tổng số các trường hợp có chuyển phôi. Thai lâm sàng chỉ được ghi nhận khi xác định được hình ảnh túi thai và đo được tim thai vào khoảng tuần thứ 7 của thai kỳ.

Tỉ lệ thai diễn tiến (ongoing pregnancy rate) được tính bằng tỉ lệ phần trăm các trường hợp có thai diễn tiến trên tổng số các trường hợp có chuyển phôi. Thai diễn tiến được định nghĩa là thai lâm sàng đã phát triển qua giai đoạn 20 tuần (≥ 20 tuần).

Xử lý số liệu

Thu thập số liệu: Nghiên cứu được thực hiện tại trung tâm IVFAS, bệnh viện An Sinh từ tháng 10/2013 đến tháng 12/2013. Thu thập số liệu được thực hiện thông qua bệnh án nghiên cứu.

Phân tích số liệu thu được: Xử lý số liệu sử dụng phần mềm SPSS 13.0.

3. Kết quả

Chúng tôi thu thập được 1694 ca đạt tiêu chuẩn nhận bệnh từ hồ sơ điều trị IVF năm 2012 và 2013 tại IVFAS. Trong đó nhóm 1 (có ít nhất một phôi tốt) là 1070 ca và nhóm 2 (không có phôi loại tốt) là 624 ca. Kết quả cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về đặc điểm tuổi vợ và độ dày niêm mạc tử cung (NMTC) giữa hai nhóm. Số lượng phôi chuyển trung bình của nhóm 1 và nhóm 2 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (2,89± 1,11 vs. 2,98± 1,02; p>0,01) (bảng 1).

Kết quả nghiên cứu cũng thể hiện tỉ lệ thai lâm sàng ở nhóm 1 cao hơn có ý nghĩa về mặt thống kê so với nhóm 2 (42,1 vs. 20,7%; RR 2,04; 95% CI 1,91 – 2,17; p=0,001).

Bảng 1. Đặc điểm bệnh nhân ở 2 nhóm nghiên cứu

	Nhóm 1 (ít nhất 1 phôi tốt)	Nhóm 2 (Không có phôi tốt)	P
Tổng số ca	1070	624	
Tuổi vợ ^a	33,00 ± 5,10	33,25 ± 5,02	0,828
NMTC (mm) ^a	11,58 ± 1,92	11,37 ± 2,21	0,013
Số phôi chuyển trung bình ^a	2,89 ± 1,11	2,98 ± 1,02	0,3

^a Giá trị trung bình ± SD

Bảng 2. Kết quả sau chuyển phôi ở 2 nhóm nghiên cứu

	Nhóm 1 (ít nhất 1 phôi tốt)	Nhóm 2 (Không có phôi tốt)	P
Tỉ lệ Beta hCG(+) (%)	46,5 (498/1070)	25 (156/624)	0,001
Tỉ lệ thai lâm sàng (%)	42,1 (451/1070)	20,7 (129/624)	0,001
Tỉ lệ thai diễn tiến (%)	37,5 (401/1070)	15,5 (97/624)	0,001

Tương tự, tỉ lệ thai diễn tiến ở nhóm 1 cao hơn có ý nghĩa về mặt thống kê so với nhóm 2 (37,5% vs. 15,5%; RR 2,41; 95% CI 2,27 – 2,55; p=0,001) (bảng 2)

4. Bàn luận

Tại các trung tâm hỗ trợ sinh sản, việc chọn lựa phôi tiềm năng để chuyển luôn là mối quan tâm hàng đầu của các chuyên viên phôi học. Phôi tiềm năng được định nghĩa là phôi hội tụ đủ 4 yếu tố sau: (i) có thể phát triển thành phôi nang vào ngày 5, (ii) có khả năng làm tổ trong buồng tử cung, (iii) có thể phát triển thành thai lâm sàng diễn tiến và (iv) sẽ phát triển và tạo thành một em bé khỏe mạnh. Việc lựa chọn phôi chuyển được thực hiện dựa trên một số đặc điểm của trứng và phôi bao gồm: hình thái trứng, đặc điểm tiên nhân, tốc độ trao đổi chất, sự biến dưỡng, chẩn đoán tiền làm tổ, hình thái phôi, hình ảnh phát triển của phôi được ghi nhận bằng hệ thống time-lapse... Trong các đặc điểm này, hình thái phôi được xem là tiêu chuẩn phổ biến nhất dùng để đánh giá và phân loại phôi.

Đánh giá phôi dựa trên hình thái thường được thực hiện vào ngày 2, ngày 3 và ngày 5 sau khi tinh trùng xâm nhập vào noãn. Thời điểm chuyển phôi thường khác nhau giữa các trung tâm, tùy thuộc vào điều kiện mỗi nơi. Ở các giai đoạn phôi 4-8 tế bào, sự phát triển của phôi phụ thuộc vào sự hoạt hoá bộ gen của noãn. Nhiều nghiên cứu cho rằng sự hoạt hoá bộ gen của phôi xảy ra vào khoảng giai đoạn 8 tế bào, trước khi phôi bước vào giai đoạn nén (compacting)[2]. Việc chuyển từ hoạt hoá bộ gen của noãn sang bộ gen của phôi là một bước quan trọng để phôi có thể tiếp tục phát triển. Hầu hết các phôi bị dừng phát triển ở giai đoạn này. Mặc dù có những hạn chế trong việc lựa chọn phôi, chuyển phôi ngày 2 vẫn được nhiều trung tâm IVF lựa chọn do lo ngại về những rủi ro khi nuôi cấy kéo dài. Chuyển phôi ngày 2 vẫn mang đến nhiều lợi ích nhất định. Nếu chúng ta biết phát huy tối đa các phương pháp đánh giá và lựa chọn phôi, vận

dụng tốt các yếu tố tiên lượng kết quả điều trị thì vẫn đạt được hiệu quả điều trị trên bệnh nhân.

Sự thành công của kỹ thuật hỗ trợ sinh sản bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, trong đó, quan trọng nhất là chất lượng phôi và sự tiếp nhận của nội mạc tử cung. Người ta ghi nhận sự tiếp nhận của nội mạc tử cung góp từ 31% đến 64% đến sự thành công này. Trong khi đó, chất lượng phôi góp từ 21% đến 32% [3]. Tuy nhiên, trong thực tế, so với sự tiếp nhận của nội mạc tử cung, chất lượng phôi lại là một biến số dễ đánh giá và ứng dụng hơn. Đó là lý do vì sao chúng tôi chọn lựa yếu tố chất lượng phôi chuyển để đánh giá khả năng tiên lượng đối với kết quả điều trị IVF.

Cho đến nay, nhiều phương pháp đánh giá phôi đã được xây dựng và phát triển từ năm 1986 để giúp các nhà phôi học chọn được phôi chất lượng cao hoặc phôi có kết quả tốt nhất. Báo cáo đầu tiên của Cummins và cs.(1986) tập trung phân tích tốc độ phát triển và hình thái của phôi[4]. Báo cáo tiếp theo của Puisants và cs. (1987) đưa ra một hệ thống đánh giá phôi khá hoàn chỉnh, trong đó tập trung phân tích số lượng, kích thước và hình dạng của phôi bào, độ phân mảnh của phôi[5]. Ý tưởng này được phát triển tiếp tục bởi Steer và cs. (1992)[6]. Tác giả đưa ra khái niệm về một hệ thống đánh giá phôi mới, gọi là CES (Cumulative Embryo Score). Hệ thống đánh giá phôi CES sau đó được sử dụng để dự đoán kết quả IVF trong một vài nghiên cứu khác[7].

Năm 2001, Terriou đã thực hiện một nghiên cứu đánh giá hiệu quả của CES, sử dụng phương pháp cho điểm dựa trên 4 đặc điểm: sự phân chia, giai đoạn phân chia, sự đồng đều của phôi bào, sự phân mảnh của phôi[8]. Nghiên cứu này đồng thời cũng đề nghị một chỉ số mới gọi là MSTE (Mean Score of Transferred Embryos) được tính bằng cách lấy CES chia cho số phôi chuyển.

Năm 2009, Vernon và cộng sự thực hiện nghiên cứu trên 70.000 phôi chuyển, cho thấy việc đánh giá phôi có tương quan với tỉ lệ sinh sống (live birth rate)[9]. Tác giả cũng đề nghị việc đánh giá phôi nên được thực hiện theo một tiêu chuẩn chung ở cấp quốc gia để đảm bảo chất lượng của việc điều trị.

Một nghiên cứu khác của Racowsky và cộng sự (2009) phân tích các đặc điểm tốc độ phân chia, tỉ lệ phân mảnh và tính đối xứng của phôi bào ở phôi ngày 3[10]. Kết quả cho thấy các đặc điểm này có tương quan với tỉ lệ sinh sống (live birth rate). Hiện tại, có nhiều nghiên cứu khác đang được tiến hành với quy mô lớn để có số liệu với cỡ mẫu lớn và đáng tin cậy hơn. Tuy nhiên, các hệ thống đánh giá phôi hiện tại vẫn đang được sử dụng và đang được chứng minh tính hiệu quả của nó.

Năm 2011, Farnaz đã tiến hành một nghiên cứu trên 508 chu kỳ IVF, so sánh hiệu quả của phương pháp đánh giá phôi của Steer và cộng sự (1992) so với Terriou và cộng sự (2001)[3]. Kết quả cho thấy phương pháp của Terriou là phương pháp tốt nhất để dự đoán kết quả thai của chu kỳ IVF. Tác giả cũng đề nghị phương pháp này nên được áp dụng tại các trung tâm IVF để chọn được những phôi tốt nhất cho chuyển phôi, đặc biệt là ở các trung tâm chuyển hơn 2 phôi.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, việc đánh giá phôi được thực hiện theo tiêu chuẩn của đồng thuận Alpha năm 2010[1]. Theo đó, việc đánh giá phôi ngày 2 được thực hiện tại thời điểm 44 ± 1 h. Phôi tốt là phôi có 4 phôi bào, đều nhau và độ phân mảnh không quá 10% thể tích phôi bào. Nếu số phôi tốt lớn hơn 3, việc lựa chọn phôi chuyển được xem xét thêm một số yếu tố khác như đặc điểm trứng vào thời điểm tiêm tinh trùng, đặc điểm của hợp tử (Z-score)... Các đặc điểm này giúp chúng tôi chọn được những phôi tốt nhất để chuyển cho bệnh nhân.

Việc sử dụng yếu tố chất lượng phôi chuyển để dự đoán kết quả thai và tỉ lệ làm tổ cũng đã được đề cập đến trong nghiên cứu của Aldo và cs. (2004)[11]. Nghiên cứu này được thực hiện trên 189 chu kỳ IVF, cho thấy số lượng phôi tốt trong chuyển phôi ngày 3 có giá trị tiên lượng cao đối với tỉ lệ thai và tỉ lệ làm tổ. Tác giả ghi nhận có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ thai (2,9% vs. 39,4%) và tỉ lệ làm tổ (2,0% vs. 19,3%) giữa nhóm không có phôi tốt và nhóm có ít nhất một phôi tốt.

Kết quả của chúng tôi cho thấy rằng số lượng phôi tốt trong số phôi được chuyển vào ngày 2 là một yếu tố tiên lượng có giá trị đối với tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ thai diễn tiến. Ở nhóm 2, khi không có phôi tốt nào trong số phôi được chuyển, tỉ lệ thai lâm sàng là 20,7% và tỉ lệ thai diễn tiến là 15,5%. Ở nhóm 1, khi có ít nhất một phôi tốt có hiện diện trong số phôi được chuyển, tỉ lệ thai lâm sàng tăng lên 42,1% (RR 2.04, 95% CI 1.91 – 2.17, $p=0.001$) và tỉ lệ thai diễn tiến cũng tăng lên là 37,5% (RR 2.41, 95% CI 2.27 – 2.55, $p=0.001$). Như vậy, nếu có ít nhất

một phôi chất lượng tốt chuyển phôi vào tử cung, tỉ lệ có thai lâm sàng và thai diễn tiến tăng hơn gấp 2 lần so với các trường hợp không có phôi chất lượng tốt.

Kết quả này sẽ hỗ trợ nhiều cho việc quyết định số phôi chuyển vào tử cung và tư vấn cho bệnh nhân trong khi điều trị. Nếu bệnh nhân có nhiều phôi và có ít nhất một phôi ngày 2 chất lượng tốt và tiên lượng các yếu tố về bệnh nhân tốt, có thể chủ động giảm số lượng phôi chuyển xuống 2 phôi. Ngoài ra, có thể cân nhắc nuôi cấy phôi dài ngày nếu số lượng phôi chất lượng tốt vào ngày 2 nhiều hơn 3 phôi. Nếu không có phôi chất lượng tốt vào ngày 2 và bệnh nhân có thêm các yếu tố tiên lượng kém khác, có thể tăng số phôi chuyển vào buồng tử cung từ 3 đến 4 phôi.

Mặc dù là nghiên cứu hồi cứu, nhưng với số lượng khảo sát lớn, đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên và có giá trị để đánh giá hiệu quả của việc sử dụng tiêu chuẩn đánh giá hình thái phôi theo Alpha vào thực tế Việt Nam. Kết quả nghiên cứu này củng cố giá trị của chọn lựa phôi ngày 2 về mặt hình thái theo tiêu chuẩn mới của Alpha. Ngoài ra, kết quả này cũng mở ra các hướng nghiên cứu mới về chọn lựa phôi, nuôi cấy phôi, quyết định số phôi chuyển vào tử cung sau IVF.

5. Kết luận

Đây là nghiên cứu đầu tiên, cỡ mẫu lớn tại Việt Nam, xác định giá trị tiên lượng của yếu tố chất lượng phôi chuyển vào ngày 2 đối với kết quả điều trị của bệnh nhân IVF, áp dụng tiêu chuẩn đánh giá phôi mới của Alpha. Chất lượng phôi chuyển dựa trên hình thái vào ngày 2 có liên quan đến tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ thai diễn tiến sau chuyển phôi tươi. Sự hiện diện của phôi tốt trong số phôi được chuyển là một yếu tố tiên lượng rất có giá trị cho kết quả điều trị của bệnh nhân.

Cần thực hiện các nghiên cứu tiến cứu với thiết kế mạnh hơn để có thể xây dựng các mô hình chọn lựa phôi, quyết định chiến lược nuôi cấy phôi, góp phần giảm số phôi chuyển phù hợp để tăng kết quả có thai và giảm thiểu tỉ lệ đa thai ở bệnh nhân IVF.

Tài liệu tham khảo

1. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction* 26(6):1270–1283.
2. Braude P, Bolton V, Moore S (1988). Human gene expression first occurs between the 4- and 8-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332:459–461.
3. Farnaz Sohrabvand, Mamak Shariat, Navid Fotoohi Ghiam, and Mahdi Hashem (2011) Comparison of two embryo scoring systems for prediction of outcome in assisted reproductive techniques cycles. *Acta Medica Iranica*, 49(12):784-7882.
4. Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. (1986). A formula for scoring human embryo growth rates in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 3(5):284-95.
5. Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F. (1987). Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod* 2(8):705-8.
6. Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG (1992). The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to

- transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 7(1):117-119
7. Visser DS, Fourie FR. (1993). The applicability of the cumulative embryo score system for embryo selection and quality control in an in-vitro fertilization/embryo transfer programme. *Hum Reprod* 8(10):1719-22.
8. Terriou P, Sapin C, Giorgetti C (2001). Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *Fertility and Sterility* 75: 525–531.
9. Vernon MW, Stern JE, Ball GD, Winingar JD, Mayer JF, Racowsky C. (2009). Utility of the national embryo morphology data collected by SART: correlation between morphologic grade and live birth rate. *Fertil Steril* 92(Suppl.):S164.
10. Racowsky C, Stern JE, Gibbons WE, Barry B, Pomeroy KO, Biggers JD (2009). National collection of embryo morphology data in SARTCORS: associations among cell number, fragmentation and blastomere asymmetry on day 3 (d3) with live birth rate. *Fertil Steril*; 92(Suppl.):S82.
11. Aldo Volpes, Francesca Sammartano, Francesco Coffaro (2004). Number of good quality embryos on day 3 is predictive for both pregnancy and implantation rates in in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 82 (5):1330-1336