

Vai trò của người ICSI trong kết quả điều trị thụ tinh ống nghiệm

Huỳnh Trọng Kha^{1*}, Nguyễn Quỳnh Nhu², Phạm Thị Kim Ngân¹, Phan Thị Kim Anh¹, Trần Tú Cầm¹

¹ IVFMD, Bệnh viện Mỹ Đức, Tân Bình

² Bệnh viện Đại học Buôn Ma Thuột

doi: 10.46755/vjog.2023.4-5.1365

Tác giả liên hệ (Corresponding author): Huỳnh Trọng Kha, email: kha.ht@myduchospital.vn

Nhận bài (received): 30/9/2023 - Chấp nhận đăng (accepted): 15/11/2023.

Tóm tắt

Sau báo cáo trường hợp có thai đầu tiên của kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection - ICSI) vào năm 1992, ICSI được xem là cuộc cách mạng trong điều trị những trường hợp tinh trùng ít, yếu và dị dạng nặng. Trong phân tích tổng hợp đa trung tâm cho thấy số chu kỳ ICSI tăng nhanh qua các năm từ 72% (2007) lên 81% (2016) của tổng số các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON). Do đó, có thể nói kỹ thuật ICSI đang là một kỹ thuật chính liên quan đến thành công của một chu kỳ ở trung tâm thụ tinh ống nghiệm hiện nay. Chính vì vậy, vai trò của chuyên viên phôi học trong thực hành ICSI rất quan trọng, có thể ảnh hưởng đến kết quả điều trị của một chu kỳ TTTON. Đặc biệt, yếu tố kinh nghiệm trong thực hành ICSI có liên quan đến tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ làm tổ cao hơn; tỷ lệ thất bại thụ tinh và tỷ lệ không phôi nang thấp. Để đánh giá hiệu quả làm việc của một chuyên viên phôi học, người ta thường dùng một số chỉ số đánh giá chính (Key performance indicators - KPIs) làm thước đo. Chỉ số này xét điểm dựa theo các chỉ số đánh giá kết hợp cân bằng giữa cả labo và lâm sàng bao gồm: tỉ lệ thoái hoá, tỉ lệ 2PN, tỉ lệ phôi hữu dụng, tỉ lệ thai lâm sàng, tỉ lệ làm tổ...

Từ khóa: ICSI, chuyên viên phôi học, kinh nghiệm thực hành.

Role of intracytoplasmic sperm injection operator experience in IVF

Huynh Trong Kha^{1*}, Nguyen Quynh Nhu², Pham Thi Kim Ngan¹, Phan Thi Kim Anh¹, Tran Tu Cam¹

¹ IVFMD, My Duc Tan Binh Hospital

² Buon Ma Thuot Medical University Hospital

Abstract

In 1992, the first child born from Intra-Cytoplasmic Sperm Injection – ICSI is a milestone for male infertility in assisted reproduction technology – ART. The proportion of ICSI in ART is increasing significantly in recent years, from 72% in 2007 to 81% in 2016. In other ways, ICSI is an important technique that affects the success rate in each IVF center. Therefore, the experience of the embryologist performing ICSI could alter results of the IVF cycle, including fertilization rate, implantation rate and number of usable embryos in that cycle. As a consequence, IVF centers use those factors to create Key performance indicators – KPIs for embryologists commonly a combination of embryology results (degeneration rate, fertilization rate, usable embryo rate) and clinical outcomes (implantation rate, clinical pregnancy rate and live birth rate).

Key words: ICSI, embryologist, operator experience.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kể từ khi Palermo và cộng sự báo cáo trường hợp có thai đầu tiên của kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (Intracytoplasmic Sperm Injection - ICSI) vào năm 1992, ICSI đã có những bước tiến triển và được xem là phương pháp điều trị có hiệu quả nhất đối với những trường hợp tinh trùng ít, yếu và dị dạng [1]. Kỹ thuật ICSI giúp cải thiện đáng kể tỷ lệ có thai và tỷ lệ em bé sinh ra ở nhiều trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) lớn trên khắp thế giới [2]. Do đó, cần nhìn nhận lại những yếu tố ảnh hưởng và xem xét các khía cạnh khác nhau trong ICSI nhằm mục đích cải thiện hiệu quả, mang lại lợi ích cho bệnh nhân điều trị TTTON.

Vai trò của người thực hiện ICSI (chuyên viên phôi học) là vô cùng quan trọng trong một chu kỳ TTTON. Tuy

nhien, vai trò này hiện nay chưa thực sự được xem xét và đánh giá đúng. Khả năng thực hiện thao tác trên giao tử của người ICSI một cách tỉ mỉ, an toàn và hiệu quả được hình thành thông qua kinh nghiệm, sự khéo léo và năng lực cá nhân của người ICSI. Ngoài ra, việc rèn luyện, học tập cũng góp phần giúp người ICSI thực hành chuẩn, đảm bảo đúng kỹ thuật để tránh gây ảnh hưởng tiêu cực đến kết quả TTTON. Việc đánh giá chất lượng công việc của người ICSI và tầm quan trọng của vai trò chuyên viên đến kết quả điều trị tương đối phức tạp. Sự ảnh hưởng của người ICSI trải dài từ những giai đoạn đầu tiên như lựa chọn tinh trùng, kỹ thuật tiêm tinh trùng vào bào tương noãn, tỉ lệ thụ tinh, chất lượng phôi và đến cuối cùng là kết quả điều trị [3]. Hiện nay, chưa có nhiều thước đo và công cụ để đánh giá các chỉ

số kỹ thuật của người ICSI. Trong bài tổng quan này, tập trung làm rõ vai trò và những điểm tác động nổi bật của người ICSI có thể dẫn đến ảnh hưởng kết quả TTTON, ngoài ra bài tổng quan còn đưa ra bộ chỉ số đánh giá chính phổ biến hiện nay có thể áp dụng trong phòng thí nghiệm hỗ trợ sinh sản.

2. TẦM QUAN TRỌNG CỦA KINH NGHIỆM NGƯỜI ICSI

2.1. Vai trò kinh nghiệm thực hành của người ICSI

Trong một nghiên cứu tổng hợp năm 2020, tổng cộng có 14.362 chu kỳ ICSI đã được phân tích. Chuyên viên phôi học ít kinh nghiệm ICSI hơn có liên quan đến tỉ lệ thụ tinh trung bình thấp hơn ($p < 0,0001$) và tỷ lệ thất bại thụ tinh cao hơn (OR 4,3; $p < 0,0001$) [4]. Tỷ lệ phôi nang hữu dụng không liên quan đến kinh nghiệm của chuyên viên phôi học ($p = 0,44$), nhưng tỷ lệ không có phôi nang hữu dụng cao hơn (OR 1,4; $p < 0,0001$) khi các chuyên viên có ít kinh nghiệm hơn thực hiện ICSI [4]. Kinh nghiệm ICSI tăng cũng liên quan đến tỉ lệ làm tổ trung bình cao hơn ($p < 0,0001$). Kết quả phôi học và lâm sàng sẽ trở nên giống nhau giữa các chuyên viên phôi học khi đã thực hiện khoảng 1.000 chu kỳ ICSI [4].

Trong một số báo cáo khác cũng cho thấy có mối quan hệ tuyến tính giữa kỹ năng của người ICSI với khả năng sống và thụ tinh của noãn [5]. Điều này có thể phụ thuộc vào thời gian hoặc kinh nghiệm trong thao tác. Maggiulli và cộng sự gần đây đã tiến hành ghi nhận thời gian ICSI của 14 chuyên viên phôi học từ 1 - 14 năm kinh nghiệm. Kết quả cho thấy thời gian ICSI có sự khác biệt đáng kể giữa các chuyên viên phôi học ($p < 0,01$) và thời gian thao tác ngắn hơn đối với chuyên viên phôi học có nhiều năm kinh nghiệm hơn [5]. Điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu quả và năng suất của phòng thí nghiệm tạo phôi.

Tùy thuộc vào kinh nghiệm của chuyên viên phôi học mà việc thực hiện ICSI sẽ có những khác biệt nhỏ đối với từng cá nhân. Những khác biệt đó có thể đến từ lực tác động lên màng bào tương noãn, vị trí ICSI hay từ sự lựa chọn tinh trùng “lý tưởng” theo cái nhìn chủ quan [6]. Những phát hiện trước đây cho thấy rằng kỹ thuật ICSI có thể dẫn đến khung xương tế bào noãn bị hư hỏng hoặc bị xáo trộn mạnh kể cả khi đã hình thành hợp tử. Các tổn thương khung xương tế bào là một trong các nguyên nhân dẫn đến sự phân chia nhiễm sắc thể bất thường, hậu quả là sự chết theo chương trình hoặc là hình thành phôi lệch bội [7]. Sự ảnh hưởng này có thể phụ thuộc vào lượng tế bào chất được hút hay lực bơm tinh trùng trong quá trình ICSI. Quá trình ICSI với sự vỡ màng noãn xảy ra ở khoảng cách ngắn (tính từ màng noãn đến đầu pipette ngay khi màng vỡ) cho số lượng phôi nang cao hơn so với khoảng cách xa hơn [7]. Ngoài ra, trong quá trình ICSI, vị trí tinh trùng nằm xa trục phân bào có thể làm giảm cơ hội thụ tinh bình thường, mặc dù noãn vẫn được hoạt hóa [8]. Những yếu tố như vậy rất khó để cân bằng giữa những người ICSI khác nhau,

phụ thuộc nhiều vào kinh nghiệm cá nhân, do đó những khác biệt về kết quả phôi học hay lâm sàng giữa những chuyên viên là điều khó tránh khỏi.

Tóm lại, có thể thấy rằng, kinh nghiệm của chuyên viên phôi học trong ICSI có liên quan đến tỉ lệ thụ tinh, phát triển phôi, tỉ lệ làm tổ và các kết quả lâm sàng về sau. Những khác biệt về mặt kinh nghiệm như vậy cũng cần được ghi nhận và theo dõi đánh giá. Ngoài ra, việc kiểm soát chất lượng có thể được đảm bảo khi ICSI với nhiều hơn một chuyên viên phôi học trên cùng một ca bệnh.

2.2. Những yếu tố chủ quan tác động đến hiệu quả ICSI

Lựa chọn vị trí ICSI

Trong khi tinh trùng gần như chỉ đóng góp vật chất di truyền và trung thể thì tế bào noãn nắm vai trò quan trọng khi cung cấp phần lớn các thành phần cần thiết còn lại cho sự hình thành và phát triển của phôi giai đoạn sớm [9]. Do đó, bất kỳ tổn thương nào gây ra cho tế bào noãn trong quá trình ICSI cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả điều trị của bệnh nhân. Khó khăn đối với kỹ thuật ICSI là xác định vị trí thoi vô sắc của tế bào noãn để lựa chọn vị trí ICSI ít tác động đến thoi vô sắc nhất. Về mặt lý thuyết, các thoi vô sắc này thường nằm gần vị trí của thể cực thứ nhất, chính vì vậy trong thực hành lâm sàng noãn được đặt ở vị trí sao cho thể cực thứ nhất hướng 12h hoặc 6h và vị trí ICSI sẽ nằm ở 3h [10]. Tuy nhiên, trong trường hợp thể cực ở 6h, đầu vát nhọn của kim ICSI sẽ hướng về phía thoi vô sắc [9]. Trong quá trình hút tế bào chất có thể sẽ gây ra sự xáo trộn xung quanh vị trí thoi vô sắc dễ dẫn đến tổn thương thoi vô sắc [9]. Những tổn thương lên thoi vô sắc sẽ gây bất thường trong phân chia nhiễm sắc thể có thể dẫn đến lệch bội hoặc gây chết theo chương trình. Vì những vấn đề liên quan đến đạo đức nên không có nhiều nghiên cứu so sánh vị trí đặt thể cực và vị trí ICSI để có thể đưa ra vị trí tối ưu nhất. Trong nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có nhóm chứng của tác giả Anifandis và cộng sự (2010) cho thấy thể cực nằm ở vị trí 11h trong ICSI dẫn đến tỉ lệ thụ tinh, chất lượng phôi và tỉ lệ thai lâm sàng cao hơn đáng kể so với các vị trí 6-7-12h [11]. Nghiên cứu này đề xuất tại vị trí thể cực 11h nên là vị trí được ưu tiên khi ICSI.

Gần đây, nhờ sự phát triển của kính hiển vi ánh sáng phân cực (Polscope) cho thấy vị trí thực tế của các thoi vô sắc không phải lúc nào cũng gần thể cực thứ nhất. Chúng có thể nằm ở nhiều vị trí khác nhau, chỉ có 67,65% tế bào noãn có thoi vô sắc nằm tiếp giáp thể cực thứ nhất và 5,88% thoi vô sắc nằm ở vị trí 60-120° so với thể cực [12]. Rõ ràng điều này cho thấy vị trí ICSI hiện nay trong thực hành lâm sàng chỉ mang tính tương đối, chưa thể xác định vị trí tối ưu trong ICSI. Do đó, dựa vào kinh nghiệm và đánh giá tại thời điểm ICSI của người thực hiện, vị trí ICSI có thể thay đổi và không cố định hoàn toàn.

Kiểm soát lực xuyên màng

Trong thao tác ICSI, lực tác động lên zona pellucida (lực xuyên ZP) cũng là một yếu tố vô cùng quan trọng, tác dụng lực quá lớn có thể gây ra những tổn thương không thể phục hồi cho tế bào noãn [13]. Để đánh giá cũng như hạn chế những tổn thương đến noãn trong quá trình ICSI, nhiều công nghệ mới đã được áp dụng với hy vọng có thể đo đạc và kiểm soát lực xuyên ZP. Lực xuyên ZP có thể đo được bằng phương pháp trực tiếp hay gián tiếp. Phương pháp đo trực tiếp chủ yếu được sử dụng để đo lực xuyên màng thông qua các cảm biến vi lực như: cảm biến lực áp trở, cảm biến lực điện dung, cảm biến lực áp điện và cảm biến lực quang học. Bên cạnh đo trực tiếp, các phương pháp đo gián tiếp cũng đã được đề xuất, bao gồm phương pháp đo dựa trên thị giác máy tính, phương pháp tính toán giải lực thông qua các hàm lực khác nhau hoặc ước tính gián tiếp lực xuyên màng thông qua đầu vào của bộ truyền động. Trong các báo cáo, phương pháp đo lực gián tiếp thường cho độ chính xác kém hơn hẳn so với đo trực tiếp [13]. Mục đích cuối cùng của việc tìm kiếm các phương pháp đo lường chính xác lực xuyên màng của các nhà nghiên cứu là mong muốn xây dựng hệ thống ICSI mà người ICSI hoàn toàn có thể kiểm soát lực này trong giới hạn cho phép. Các phương pháp đo có thể được kết hợp với nhau và được tích hợp vào hệ thống vi thao tác, đồng thời được trang bị thêm bộ điều khiển (trở kháng, phi tuyến, ...) để đảm bảo lực xuyên màng trong quá trình ICSI có thể được điều chỉnh theo quỹ đạo mong muốn [14]. Tuy nhiên, cho đến thời điểm hiện tại, đây vẫn còn là một hướng nghiên cứu còn khá mới, những báo cáo về vấn đề này còn khá ít ỏi và hiệu quả chưa rõ ràng. Tuy vậy, tiềm năng của hướng nghiên cứu này là rất lớn, việc có thể đo lường và kiểm soát được lực xuyên ZP không những giúp ích cho chuyên viên phôi học trong quá trình ICSI mà còn mang lại nhiều hy vọng giúp nâng cao và tăng hiệu quả của quá trình ICSI.

Lựa chọn tinh trùng trong ICSI

Trong ICSI, việc lựa chọn tinh trùng có tính chất quan trọng tuy nhiên lại phụ thuộc nhiều vào tính chủ quan của người ICSI. Mặc dù tất cả người ICSI đều được đào tạo trước đó nhưng không tránh khỏi sự sai khác trong thực hành giữa các cá nhân khác nhau. Hiện nay, trong thực hành lâm sàng hầu hết các trung tâm đều lựa chọn tinh trùng cho ICSI dựa vào hình thái và tính di động của tinh trùng. Các tinh trùng được cho là “bình thường” sẽ được tiêm vào bào tương noãn, tuy vậy tiêu chuẩn “bình thường” có thể khác nhau giữa các chuyên viên phôi học. Sự khác biệt có thể mang tính chất chủ quan phụ thuộc vào năng lực và kinh nghiệm của người ICSI. Ngoài ra, các yếu tố khách quan như chất lượng hệ thống kính ICSI, tính chất mẫu tinh trùng quá yếu, kém dẫn đến việc lựa chọn tinh trùng gặp nhiều khó khăn.

Trong một số trường hợp đặc biệt, việc lựa chọn tinh trùng còn phải phụ thuộc rất nhiều vào kinh nghiệm

người thực hành. Đối với những bệnh nhân thu nhận tinh trùng bằng thủ thuật (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration-MESA, Testicular sperm extraction-TESE, Microscopic testicular sperm extraction- microTESE,...) hầu hết tinh trùng đều chưa có sự trưởng thành hoàn toàn do đó phần lớn chúng bất động. Người ICSI gặp khó khăn nếu chỉ dựa vào hình dạng hay cách di chuyển của tinh trùng để lựa chọn. Năm 1984, Jeyendran và cộng sự giới thiệu phương pháp thử nghiệm nhược trương (Hypo-osmotic swelling-HOS) giúp đánh giá khả năng sống của tinh trùng nhằm thay thế phương pháp nhuộm thông thường [15]. Nguyên tắc của phương pháp này là cho tinh trùng tiếp xúc với môi trường nhược trương và ủ trong thời gian ngắn, những tinh trùng còn sống sẽ có màng nguyên vẹn, sự di chuyển của nước từ môi trường vào bên trong tinh trùng khiến cho đuôi tinh trùng căng phồng và có thể quan sát dưới kính hiển vi [15]. Kể từ khi ra đời, phương pháp HOS cho thấy giúp cải thiện tỷ lệ thụ tinh và chất lượng phôi trong trường hợp tinh trùng từ thủ thuật hoặc bất động 100% ở nhiều nghiên cứu [16], [17]. Tuy vậy, việc lựa chọn tinh trùng nhờ phương pháp HOS phụ thuộc vào rất nhiều vào người ICSI. Việc phân biệt tinh trùng có sự căng phồng ở đuôi trong môi trường HOS yêu cầu chuyên viên cần có nhiều kinh nghiệm thực hành trước đó. Việc nhầm lẫn phản ứng của tinh trùng trong môi trường HOS có thể dẫn đến tiêm nhầm tinh trùng đã chết và gây thất bại thụ tinh.

Khả năng di động của tinh trùng còn có thể được kích hoạt bởi các tia laser [18]. Với những tinh trùng bất động còn sống, việc chiếu tia laser vào đuôi có thể giúp giải phóng Ca^{2+} và tăng tổng hợp ATP, tạo ra sự chuyển động nhẹ đuôi tinh trùng như cong hay cuộn đuôi [18]. Kỹ thuật này đặc biệt có hiệu quả ở những mẫu tinh trùng từ thủ thuật như TESE, giúp cải thiện tỷ lệ thụ tinh đáng kể từ 20,4% ở nhóm lựa chọn tinh trùng ngẫu nhiên so với 45,4% ở nhóm chọn lọc bằng laser. Điều này cũng dẫn đến tỉ lệ trẻ sinh sống tăng từ 5,9% lên 19% [18]. Dường như phương pháp sử dụng laser mang lại hiệu quả cho những chu kỳ điều trị với tinh trùng bất động hay tinh trùng từ thủ thuật. Tuy nhiên, tương tự như HOS phương pháp này yêu cầu chuyên viên phôi học có kinh nghiệm để có thể nhận biết sự cuộn đuôi tinh trùng chính xác nhất [18].

Nhìn chung, hiện tại việc lựa chọn tinh trùng cho ICSI còn phụ thuộc nhiều vào tính chủ quan của người ICSI. Ở những trường hợp tinh trùng bất động hoàn toàn có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau. Trong đó, phương pháp HOS hay tia laser đang được sử dụng trong thực hành lâm sàng và đều mang lại những cải thiện đáng kể trong kết quả điều trị [19]. Dù lựa chọn phương pháp nào thì vai trò kinh nghiệm của người ICSI trong việc lựa chọn tinh trùng là rất lớn. Để mang lại một kết quả điều trị tối ưu cho bệnh nhân, những trường hợp tinh trùng bất động hoàn toàn cần có chuyên viên

phôi học nhiều kinh nghiệm để giúp giảm thiểu thời gian ICSI cũng như lựa chọn tinh trùng chính xác.

Các KPI trong đánh giá trong thực hành ICSI

Để đánh giá hiệu quả làm việc của một chuyên viên phôi học, người ta thường dùng chỉ số KPI (Key performance indicators) làm thước đo. Điểm số KPI được xét dựa theo các đánh giá kết hợp giữa lâm sàng (C-KPIs) và labo (L-KPIs) bao gồm: thoái hoá, tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ 2PN, tỉ lệ phôi hữu dụng. Tuy nhiên, khi xét các chỉ số KPI của một chuyên viên phôi học cần kết hợp thêm các mô hình dùng để tiên lượng kết quả điều

trị của một ca nhằm có cái nhìn tổng quan về năng lực. Điển hình, trong mô hình của Petersen và cộng sự (2018), cách tính điểm cho một ca điều trị được xét duyệt là tiên lượng tốt hay xấu như hình 1 [20].

Một ca được đánh giá là tốt khi:

- KPIs lâm sàng (C-KPIs): điểm C-KPIs: ≥ 9
- KPIs trong phòng thí nghiệm (L-KPIs): điểm L-KPIs:

> 6

Tóm lại, việc đánh giá, xem xét năng lực ICSI của một chuyên viên phôi học cần cân nhắc đầy đủ giữa các chỉ số KPI với mức độ tiên lượng ca ICSI đó.

		5 điểm	3 điểm	1 điểm
C- KPIs	Tuổi	≤ 36	37-39	≥ 40
	AMH	≥ 2	$\geq 1 - < 2$	< 1
	Số noãn	≥ 7	4-6	≤ 3
L- KPIs	Tỷ lệ phôi hữu dụng	$\geq 65\%$	$\geq 50\% - < 65\%$	$< 50\%$
	Chất lượng phôi	≥ 2 phôi tốt	1 phôi tốt và ≥ 2 phôi trung bình	chỉ có phôi chất lượng thấp

Hình 1. Hệ thống điểm số KPIs theo mô hình Petersen và cộng sự [20].

3. KẾT LUẬN

Trong kỹ thuật ICSI, vai trò người ICSI có ảnh hưởng đến kết quả điều trị. Những chuyên viên phôi học với nhiều năm kinh nghiệm cho thấy có kết quả điều trị tốt hơn so với người ít kinh nghiệm. Những khác biệt về mặt kinh nghiệm như vậy cũng cần được ghi nhận và theo dõi, ngoài ra, việc kiểm soát chất lượng có thể được đảm bảo khi thực hiện ICSI với nhiều hơn 1 chuyên viên phôi học trên cùng một ca bệnh.

Phòng thí nghiệm hỗ trợ sinh sản có thể sử dụng hoặc xây dựng bộ KPI phù hợp để đánh giá hiệu năng làm việc của người ICSI. Tuy nhiên, cần thận trọng trong việc đánh giá và xem xét năng lực của một chuyên viên phôi học, phải đảm bảo đánh giá đầy đủ giữa các chỉ số KPI labo và mức độ tiên lượng về mặt lâm sàng của ca điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. G. Palermo, H. Joris, P. Devroey, and A. C. Van Steirteghem, "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte," *Lancet*, vol. 340, no. 8810, pp. 17–18, Jul. 1992, doi: 10.1016/0140-6736(92)92425-f.
2. T. L. Glenn, A. M. Kotlyar, and D. B. Seifer, "The Impact of Intracytoplasmic Sperm Injection in Non-Male Factor Infertility-A Critical Review," *J Clin Med*, vol. 10, no. 12, p. 2616, Jun. 2021, doi: 10.3390/jcm10122616.
3. F. Choucair, N. Younis, and A. Hourani, "The value of the modern embryologist to a successful IVF system: revisiting an age-old question," *Middle East Fertil Soc J*, vol. 26, no. 1, p. 15, May 2021, doi: 10.1186/s43043-021-00061-8.

4. A. W. Tiegs and R. T. Scott, "Evaluation of fertilization, usable blastocyst development and sustained implantation rates according to intracytoplasmic sperm injection operator experience," *Reprod Biomed Online*, vol. 41, no. 1, pp. 19–27, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.rbmo.2020.03.008.
5. R. Maggiulli et al., "The effect of ICSI-related procedural timings and operators on the outcome," *Hum Reprod*, vol. 35, no. 1, pp. 32–43, Jan. 2020, doi: 10.1093/humrep/dez234.
6. L. A. J. Van der Westerlaken, F. M. Helmerhorst, J. Hermans, and N. Naaktgeboren, "Intracytoplasmic sperm injection: position of the polar body affects pregnancy rate," *Human Reproduction*, vol. 14, no. 10, pp. 2565–2569, Oct. 1999, doi: 10.1093/humrep/14.10.2565.
7. J. C. M. Dumoulin et al., "Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure*," *Human Reproduction*, vol. 16, no. 2, pp. 306–312, Feb. 2001, doi: 10.1093/humrep/16.2.306.
8. Blake, M., Garrisi, G. I., & Sadowy, S., "Sperm head and spindle position during intracytoplasmic sperm injection determine fertilization and development outcome." In 52nd Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine., vol. 1;41(1):19–27., no. 4, p. 2, 1996.
9. P. Rubino, P. Viganò, A. Luddi, and P. Piomboni, "The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects," *Hum Reprod Update*, vol. 22, no. 2, pp. 194–227, Apr. 2016, doi: 10.1093/humupd/dmv050.
10. B. J. Woodward, S. J. Montgomery, G. M. Hartshorne, K. H. Campbell, and R. Kennedy, "Spindle position assessment prior to ICSI does not benefit fertilization or early embryo quality," *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 16, no. 2, pp. 232–238, Jan. 2008, doi: 10.1016/S1472-6483(10)60579-2.
11. G. Anifandis, K. Dafopoulos, C. I. Messini, N. Chalvatzas, and I. E. Messinis, "Effect of the position of the polar body during ICSI on fertilization rate and embryo development," *Reprod Sci*, vol. 17, no. 9, pp. 849–853, Sep. 2010, doi: 10.1177/1933719110372421.
12. T. T. Nguyen, H. T. Doan, and L. H. Quan, "The spindle of oocytes observed by polarized light microscope can predict embryo quality," *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*, vol. 8, no. 1, pp. 131–134, Dec. 2018, doi: 10.18203/2320-1770.ijrcog20185408.
13. Y. Ma et al., "Recent advances in critical nodes of embryo engineering technology," *Theranostics*, vol. 11, no. 15, pp. 7391–7424, 2021, doi: 10.7150/thno.58799.
14. Y. Xie, D. Sun, C. Liu, H. Y. Tse, and S. H. Cheng, "A Force Control Approach to a Robot-assisted Cell Microinjection System," *The International Journal of Robotics Research*, vol. 29, no. 9, pp. 1222–1232, Aug. 2010, doi: 10.1177/0278364909354325.
15. R. S. Jeyendran, H. H. Van der Ven, M. Perez-Pelaez, B. G. Crabo, and L. J. Zaneveld, "Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics," *J Reprod Fertil*, vol. 70, no. 1, pp. 219–228, Jan. 1984, doi: 10.1530/jrf.0.0700219.
16. H. N. Sallam, A. Farrag, A.-F. Agameya, Y. El-Garem, and F. Ezzeldin, "The use of the modified hypo-osmotic swelling test for the selection of immotile testicular spermatozoa in patients treated with ICSI: a randomized controlled study," *Hum Reprod*, vol. 20, no. 12, pp. 3435–3440, Dec. 2005, doi: 10.1093/humrep/dei249.
17. N. Charehjooy et al., "Selection of Sperm Based on Hypo-Osmotic Swelling May Improve ICSI Outcome: A Preliminary Prospective Clinical Trial," *Int J Fertil Steril*, vol. 8, no. 1, pp. 21–28, 2014.
18. V. Nordhoff et al., "Optimizing TESE-ICSI by laser-assisted selection of immotile spermatozoa and polarization microscopy for selection of oocytes," *Andrology*, vol. 1, no. 1, pp. 67–74, Jan. 2013, doi: 10.1111/j.2047-2927.2012.00020.x.
19. V. Nordhoff, "How to select immotile but viable spermatozoa on the day of intracytoplasmic sperm injection? An embryologist's view," *Andrology*, vol. 3, no. 2, pp. 156–162, 2015, doi: 10.1111/andr.286.
20. J. G. Franco Jr et al., "Key performance indicators score (KPIs-score) based on clinical and laboratorial parameters can establish benchmarks for internal quality control in an ART program," *JBRA Assist Reprod*, vol. 21, no. 2, pp. 61–66, 2017, doi: 10.5935/1518-0557.20170016.