

Phân mảnh phôi và các ảnh hưởng trên kết quả điều trị hỗ trợ sinh sản

Nguyễn Thị Quỳnh Tiên¹, Đặng Thị Huyền Trang¹, Nguyễn Ngọc Quỳnh¹

¹Bệnh viện Đa khoa Mỹ Đức

doi:10.46755/vjog.2020.1.79103

Tác giả liên hệ (Corresponding author): Nguyễn Thị Quỳnh Tiên, email: tien.ntq@myduchospital.vn

Nhận bài (received) 05/12/2019 - Chấp nhận đăng (accepted) 20/04/2020

Tóm tắt

Trong kỹ thuật hỗ trợ sinh sản, chỉ có một số ít noãn phát triển thành phôi chất lượng tốt để sử dụng chuyển cho bệnh nhân. Hình thái phôi là một trong các tiêu chí để chọn lựa phôi chuyển cho bệnh nhân. Hình thái phôi thể hiện qua số lượng tế bào, độ đồng đều phôi bào, và tỷ lệ của các mảnh vụn phôi bào. Trong đó, phân mảnh được xem là tiêu chí quan trọng bởi vì phân mảnh càng nhiều khả năng phôi phát triển càng kém. Những phôi có nhiều phân mảnh làm hạn chế tiềm năng phát triển và làm tổ của phôi. Phân mảnh phôi là các phần nhỏ của tế bào chất được bao bọc bởi màng tế bào nhưng thường không có DNA, hình thành trong quá trình phân chia của tế bào. Sự phân mảnh phôi phụ thuộc vào nhiều yếu tố như điều kiện nuôi cấy, buồng trứng đáp ứng kém, chất lượng tinh trùng, tuổi vợ cao, chất lượng noãn, quy trình kích thích buồng trứng. Nội dung của bài tổng quan sau xin trình bày về cơ chế gây ra phân mảnh phôi, các dạng phân mảnh và ảnh hưởng của phân mảnh phôi lên kết quả điều trị trong IVF.

Từ khóa: phân mảnh phôi, phân mảnh lớn, phân mảnh rời rạc.

Embryo fragmentation and its impacts on ivf outcomes

Nguyen Thi Quynh Tien¹, Dang Thi Huyen Trang¹, Nguyen Ngoc Quynh¹

¹My Duc General Hospital

Summary

When performing assisted reproductive technology, only a few oocytes develop into good-quality embryos for transfer. Assessment of embryo morphology is a criterion for selecting transferred embryo. Morphological embryo evaluation includes the number, uniformity of blastomeres and grade of fragmentation. In particular, fragmentation is considered an important criterion because fragmented embryos have limited developmental potential and rarely result in implantation. Fragmentation is small portions of cytoplasm enclosed by a cell membrane but usually not containing DNA are often formed during cell division. Fragmentation depends on embryo culture conditions, poor ovarian response, semen quality, maternal age, oocyte quality and ovarian stimulation. The aim of this review article is to provide an overview of the embryo fragmentation mechanisms, fragmentation patterns and impact of the degree of fragmentation on the IVF outcome.

Keyword: embryo morphology

1. ĐẠI CƯƠNG

Phân mảnh phôi là các phần nhỏ của tế bào chất được bao bọc bởi màng tế bào nhưng thường không có DNA, hình thành trong quá trình phân chia của tế bào. Phân mảnh được định nghĩa là một cấu trúc không nhân, có màng tế bào bao bọc một lượng tế bào chất, được tìm thấy ở khoảng không gian giữa những phôi bào hoặc giữa phôi bào và màng trong suốt (zona pellucida-ZP) [1].

Mức độ phân mảnh được đánh giá trong hầu hết mọi hệ thống tính điểm của phôi. Mức độ phân mảnh thường được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm của tổng thể tích tế bào chất. Có 5 dạng phân mảnh thường gặp trong *in-vitro*, đặc biệt là dạng phân mảnh rải rác và phân mảnh

lớn. Một số nghiên cứu cho rằng để tăng tỷ lệ mang thai thì không nên chuyển những phôi có phân mảnh [2,3]. Nghiên cứu của Seok-Gi và cộng sự (2018) thực hiện việc loại bỏ các phân mảnh phôi ra khỏi phôi ngày 2 giúp cải thiện đáng kể tiềm năng phát triển và kết quả thai ở những phôi phân mảnh [4]. Phân mảnh phôi ở giai đoạn phôi phân chia *in-vitro* thì không hoàn toàn liên quan đến sự phá hủy phôi hoặc do chu trình chết tế bào như đề xuất trước đây [5].

Ngược lại, trong một số trường hợp, sự phân mảnh là không thể thiếu trong sự phát triển *in-vitro* bình thường. Nội dung của bài tổng quan xin trình bày khái quát về cơ chế gây ra phân mảnh phôi và ảnh hưởng của phân mảnh phôi đến kết quả điều trị trong IVF.

2. CƠ CHẾ TẠO RA PHÂN MẢNH PHÔI

Hiện nay, vẫn chưa rõ nguyên nhân gây ra phân mảnh và các cơ chế liên quan. Mặc dù có một số giả thuyết đã được đưa ra, nhưng vẫn chưa có một dữ liệu rõ ràng giải thích cơ chế cụ thể. Trong những trường hợp cụ thể, một bệnh nhân có thể có những phôi bị phân mảnh trong khi một số khác thì không và phân mảnh phôi cũng thay đổi trong cùng một bệnh nhân ở những chu kỳ khác nhau.

Một số giả thuyết về cơ chế tạo ra phân mảnh phôi:

Thứ nhất, phân mảnh có thể bắt nguồn từ tế bào noãn: các khiếm khuyết vốn có trong noãn thường ảnh hưởng đến chất lượng phôi và khả năng phát triển của nó. Các nghiên cứu trên noãn chuột cho thấy sự hoạt hóa noãn là điều kiện dẫn đến sự phân mảnh và sự phân mảnh xảy ra trong giai đoạn phân chia tế bào (cytokinetic phase) của chu kỳ tế bào [6]. Một số nghiên cứu cho thấy mối tương quan giữa hình thái tế bào noãn và sự phân mảnh phôi, và sự phát triển phôi có tương quan với khả năng phát triển của nhân và tế bào chất của noãn [7,8].

Thứ hai là do quy trình kích thích buồng trứng. Chất lượng noãn thu được trong chu kỳ IVF có liên quan trực tiếp đến phác đồ kích thích buồng trứng. Do vậy, việc sử dụng gonadotropin ngoại sinh có thể ảnh hưởng đến tiềm năng phát triển của noãn. Tuy nhiên, vẫn chưa có bằng chứng xác thực đối với một quy trình nhất định có đưa đến mức độ phân mảnh cao hay không. Ziebe và cộng sự đã báo cáo rằng có 61% phôi có được từ kích thích buồng trứng với gonadotropin có mức độ phân mảnh < 10% ở ngày 2 trong khi tỉ lệ này là 69% ở nhóm phôi từ chu kỳ tự nhiên không kích thích (sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê). Trong nghiên cứu MERIT (Menotropin so với FSH tái tổ hợp sử dụng trong IVF), kích thích buồng trứng bằng hMG cho kết quả là 83% phôi phân mảnh ở mức độ < 20%, lớn hơn đáng kể so với sử dụng FSH (77%) [9,10].

Thứ ba, môi trường nuôi cấy của phôi rất quan trọng đối với sự phát triển của phôi. Môi trường nuôi cấy không tối ưu sẽ có thể dẫn đến tăng mức độ phân mảnh của phôi. Các ROS được phát hiện trong môi trường nuôi cấy có mối tương quan đến phân mảnh [11]. Theo Browne và cộng sự, có mối tương quan nghịch giữa cholesterol HDL và apolipoprotein AI (ApoAI) với sự phân mảnh phôi [12].

Cuối cùng, cần kể đến sự đóng góp từ yếu tố tinh trùng. Bằng chứng lâm sàng cho thấy là sự phát triển phôi dị tật ở giai đoạn sớm có thể liên quan đến chất lượng tinh trùng. Nghiên cứu của Su Mi Kim và cộng sự (2019) đánh giá ảnh hưởng của phân mảnh DNA tinh trùng đến chất lượng phôi, kết luận rằng với mức độ phân mảnh DNA tinh trùng (SDF) $\geq 30\%$ sẽ gây ra hiện tượng phôi phân mảnh và chất lượng phôi kém hơn nhóm có phân mảnh DNA tinh trùng < 30% [13].

3. CÁC DẠNG PHÂN MẢNH PHÔI

Mức độ phân mảnh và số lượng tế bào là tiêu chuẩn cơ bản để lựa chọn phôi chuyển. Trong một số phòng thí nghiệm, phân mảnh phôi vẫn được sử dụng để đánh giá và phân loại phôi.

Các kiểu phân mảnh được phân biệt dựa trên kích thước, vị trí phân bố các phân mảnh và vị trí của tế bào có nhân (Hình 1):

Loại I: phân mảnh ít, chỉ xuất hiện ở một phôi bào.

Loại II: nhiều phân mảnh nhỏ và tập trung ở một hoặc nhiều tế bào.

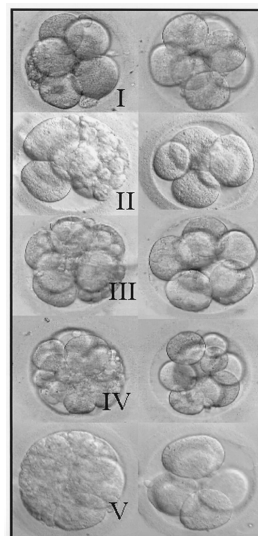
Loại III: phổ biến nhất, phân mảnh nhỏ, rải rác ở nhiều phôi bào.

Loại IV: phân mảnh lớn và rải rác đi cùng với những tế bào không bằng nhau.

Loại V: phân mảnh tập trung nhiều ở dạng hạt đi cùng với phôi bào có tế bào chất co lại. Một số phôi thì không phân biệt được thuộc ở loại nào.

Phôi phân mảnh lớn (large fragment)

Trong quá trình phân chia, không phải tất cả các phôi bào đều phân chia thành hai tế bào bằng nhau. Đường kính của tế bào/phân mảnh khác nhau từ 20 μm đến 75 μm . Sự phân chia không đối xứng của tế bào cũng có thể là vì vị trí của thoi vô sắc không cân đối. Sự cân bằng của cả nhân và tế bào chất đều có thể bị ảnh hưởng xấu bởi sự phân chia không đồng đều. Phôi có phân mảnh lớn phân bố ngẫu nhiên và thường đi cùng với các phôi bào không bằng nhau (hình 2) [14].



Hình 1. Phôi phân mảnh ngày 3 với các dạng I, II, III, IV, V. Bên trái: những phôi ngày 3 trước khi loại bỏ các mảnh vụn phôi bào. Bên phải: hình ảnh sau khi loại bỏ các mảnh vụn. Hình ảnh cho thấy sự khác biệt rõ ràng về hình thái và cách sắp xếp của các phôi bào còn lại sau khi loại bỏ các dạng mảnh vụn khác nhau [15].

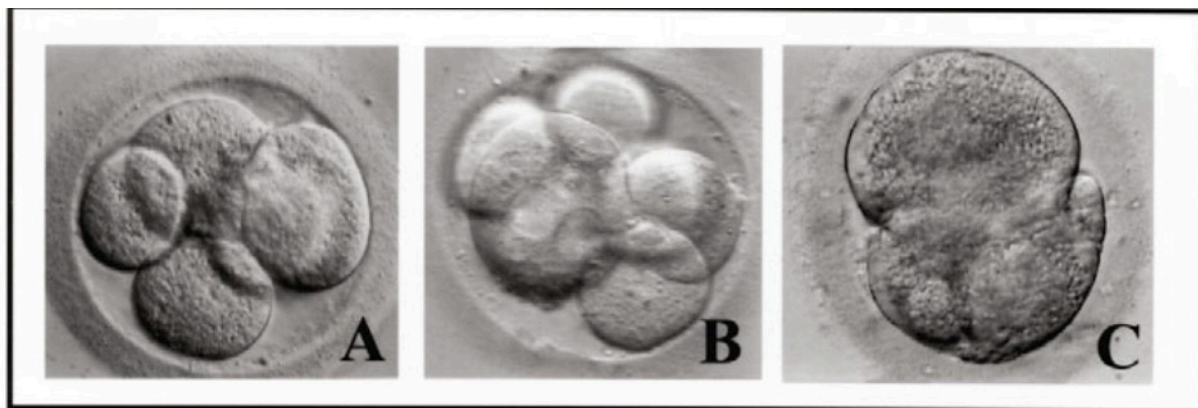
Ở mỗi phôi phân mảnh, rất khó đánh giá phân mảnh lớn không nhân so với phôi bào, phân mảnh là một phần của tế bào chất có đường kính < 45 μm đối với phôi ngày 2 và có đường kính < 40 μm đối với phôi ngày 3 [16]; dựa trên những nghiên cứu trên cấu trúc tế bào chất ở những phân mảnh có kích thước như vậy cho thấy không chứa DNA. Ở phôi ngày 2, giai đoạn 4 tế bào, phôi bào cần phân chia bằng nhau, khoảng 65 - 70 μm . Ở phôi ngày 3, phôi bào được cho là nhỏ hơn, khoảng 55 - 56 μm . Nhỏ hơn kích thước này rất khó tìm thấy hiện diện của DNA, nếu có, chỉ có dạng DNA phân mảnh. Đối với những phân mảnh lớn sẽ làm mất đi một lượng lớn thể tích của tế bào chất, gây bất lợi cho chức năng của tế bào và phôi. Việc đẩy ra những phân mảnh lớn ở giai đoạn đầu phân chia có thể làm thiếu hụt những bào quan cần thiết của phôi bào, như ti thể, mRNA và protein và dẫn đến tế bào có thể ngừng phát triển.

Theo tác giả Alikani (2000), phân mảnh lớn gây bất lợi cho sự phát triển của phôi [2]. Tỷ lệ thai lâm sàng giảm đáng kể khi chuyển phôi có phân mảnh lớn so với nhóm phân mảnh khác (40% so với 58,5%). Sự hiện diện của phân mảnh lớn (phân mảnh 26 - 35%) có tác động bất lợi đến tiềm năng phát triển phôi, ngược lại, phân

mảnh tại chỗ hoặc nhỏ hoặc phân mảnh rời rạc không ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ làm tổ. Khi nuôi cấy thêm, phôi có phân mảnh lớn hoặc > 15% phân mảnh có tỷ lệ tạo phôi nang thấp hơn đáng kể so với phân mảnh \leq 15% hoặc các dạng phân mảnh khác.

Phôi phân mảnh rải rác (scatter fragment)

Khi mức độ phân mảnh tương tự nhưng dạng phân mảnh rải rác khắp phôi sẽ làm giảm tỷ lệ làm tổ hơn so với dạng tập trung một chỗ [17]. Khuynh hướng bất thường nhiễm sắc thể cũng cao hơn ở phôi có phân mảnh rời rạc so với phôi phân mảnh tập trung một vị trí. Nghiên cứu của Cristina (2007) khẳng định tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể cao hơn ở phôi có phân mảnh phân bố rải rác so với phân mảnh tập trung một chỗ. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở phân mảnh từ 21 - 40% (80% ở phân mảnh rải rác và 57% ở phân mảnh tập trung một chỗ; $p < 0,03$) [17]. Những phôi không phân mảnh hay phân mảnh tập trung tại một chỗ, tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể khác nhau ở từng giai đoạn tế bào, không phân biệt mức độ phân mảnh. Ngược lại, ở những phôi phân mảnh rải rác, tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể cao hơn đáng kể ở phôi 7 tế bào hoặc 8 tế bào khi so với phôi có phân mảnh tập trung [17].



Hình 2. Phôi phân chia không đối xứng phát triển trong *in-vitro*. (A) mất đi một lượng thể tích lớn tế bào chất ở dạng phân mảnh dẫn đến xuất hiện nhóm tế bào không bằng nhau (phân mảnh được loại bỏ). (B) những tế bào không bằng nhau có thể xuất hiện do dừng phân chia của 1 hoặc nhiều tế bào, trong những trường hợp này, nếu nhân vẫn tiếp tục phân chia, tế bào dừng phát triển sẽ có đa nhân. (C) Một dạng kích thước phôi bào không bằng nhau, một tế bào lớn duy nhất bên cạnh các tế bào nhỏ hơn, thường có bộ nhiễm sắc thể đa bội [14].

4. ẢNH HƯỞNG CỦA PHÂN MẢNH PHÔI ĐẾN KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ

Ảnh hưởng của sự phân mảnh lên sự phát triển tiền làm tổ

Theo đánh giá ảnh hưởng của sự phân mảnh lên quá trình tạo phôi nang cho thấy, với độ phân mảnh càng tăng (0 - 15% và > 15%), sẽ ít có phôi trải qua giai đoạn nén, tạo khoang và phôi nang bình thường. Phân mảnh vượt quá 35%, ảnh hưởng rất nghiêm trọng đến chất lượng phôi, vì vậy, hầu hết các phôi nang chọn để chuyển có độ

phân mảnh < 15% ở ngày 3. Ngoài ra, sự phân mảnh còn ảnh hưởng lên phân bố của các tế bào trong quá trình biệt hóa [2]. Theo một nghiên cứu, sự phân mảnh tăng không chỉ dẫn đến giảm sự hình thành phôi nang mà còn giảm số lượng tế bào của phôi nang. Nếu phôi phân mảnh ở mức ít đến trung bình, chỉ làm giảm số lượng tế bào ở ngoại bì lá nuôi (Trophectoderm - TE), còn số lượng tế bào ở khối nội phôi bào (Inner Cell Mass - ICM) vẫn ổn định. Nhưng nếu mức độ phân mảnh vượt quá 25%, số lượng tế bào sẽ giảm ở cả TE và ICM [18].

Mối liên hệ giữa loại phân mảnh và sự hình thành phôi nang trong nghiên cứu của Stone BA (2005) cho thấy ở những phôi không có phân mảnh hoặc phân mảnh loại I có tỷ lệ hình thành phôi nang cao hơn phôi loại II hoặc III; còn phôi loại IV không tạo thành phôi nang bình thường [19].

Ảnh hưởng của phân mảnh phôi lên sự làm tổ, tỷ lệ thai lâm sàng và tỷ lệ sinh sống

Nghiên cứu ban đầu của Alikani (1999) cho thấy tỷ lệ làm tổ và mang thai giảm khi phần lớn phôi chuyển là phôi phân mảnh loại I, loại II, loại III hoặc loại IV. Tuy nhiên, tỷ lệ làm tổ giảm nhiều nhất là ở phôi phân mảnh loại IV, loại phôi có mức độ phân mảnh cao nhất, khả năng tồn tại của phôi loại IV khoảng 25% [15].

Một phân tích về phôi chuyển cùng loại đối với các loại phân mảnh (1263 người chuyển và 2703 phôi được chuyển) cho thấy tỷ lệ làm tổ cao nhất đạt được sau khi chuyển phôi có độ phân mảnh loại I, trong khi đó, tỷ lệ làm tổ và có thai kém nhất khi chuyển phôi có độ phân mảnh loại IV. Những phôi có độ phân mảnh loại II có khả năng làm tổ thường cao hơn phôi có độ phân mảnh loại III, nhưng phôi loại II có số lượng tế bào ít hơn phôi loại III ($5,4 \pm 1,5$ so với $6,1 \pm 1,3$ tế bào ở tất cả các phôi; $6,6 \pm 1,7$ so với $7,3 \pm 1,3$ tế bào ở phôi được chuyển). Tuy nhiên, tỷ lệ mang thai thấp hơn đáng kể khi chuyển phôi loại II so với phôi loại III (32,9% so với 49%). Những phôi phân mảnh loại IV có ít tế bào hơn ($5,2 \pm 1,4$) ở ngày 3 và tỷ lệ làm tổ thấp hơn nhiều so với tất cả các loại phân mảnh khác.

Dữ liệu ảnh hưởng của sự phân mảnh lên kết quả thai nhi không nhiều. Một nghiên cứu của Ebner T và cộng sự (2001) cho thấy chuyển phôi có độ phân mảnh 25% đến > 50% dẫn đến tỷ lệ bất thường thai nhi cao hơn đáng kể so với chuyển phôi có độ phân mảnh < 25%. Trong số 180 trẻ sinh ra sau 309 phôi được chuyển ở nhóm phân mảnh < 25%, nhóm tác giả quan sát thấy có 4 dị tật nhỏ xảy ra trên các trẻ này. Ở các nhóm khác, gồm 75 phôi chuyển với tỷ lệ phân mảnh 25 – 50%, có 1 trường hợp trisomy 21 và 1 trường hợp bị u xơ tử cung trong số 13 trẻ sinh ra. Trong số 19 trẻ sinh ra sau 76 phôi chuyển có độ phân mảnh là > 50%, có 2 trường hợp trisomy 18 và một trường hợp tràn dịch não [20].

Hai nghiên cứu về ảnh hưởng của mức độ phân mảnh phôi đến kết quả IVF bao gồm nghiên cứu của Giorgetti và cộng sự (1995) và của Ziebe và cộng sự (1997). Các tác giả đã báo cáo tỷ lệ làm tổ gần 5% sau chuyển những phôi có 10 – 50% phân mảnh vào ngày 2. Đáng chú ý, gần 50% phôi < 35% phân mảnh có đầy đủ NST sau khi chẩn đoán tiền làm tổ, ngược lại, tỷ lệ này thấp hơn đáng kể ở những phôi > 35% phân mảnh [3,21].

5. KẾT LUẬN

Chất lượng của phôi *in-vitro* phụ thuộc vào nhiều yếu tố liên quan đến các quy trình kỹ thuật. Có nhiều giả thiết về cơ chế gây ra sự phân mảnh phôi được đề xuất, tuy nhiên, hầu hết các cơ sở đều chưa rõ ràng. Ảnh hưởng của phôi phân mảnh lên tiềm năng làm tổ xác định dựa trên sự phân bố, hình thái, và tỷ lệ của các phân mảnh. Sử dụng hệ thống phân loại phôi giúp các chuyên viên phôi học lựa chọn được những phôi có tiềm năng nhất để chuyển phôi cho bệnh nhân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Keltz Martin D, Skorupski Josh C, Bradley Katrina, Stein Daniel. Predictors of embryo fragmentation and outcome after fragment removal in *in-vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*. 2006; 86(2):321-324.
2. Alikani M, Calderon G, Tomkin G et al. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture *in-vitro*. *Hum Reprod* 2000; 15: 2634–43.
3. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, et al. Embryo score to predict implantation after *in-vitro* fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995; 10:2427-3.
4. Seok-Gi Kim, Youn-Young Kim, Ji-Young Park, Su-Jin Kwak, Chang-Seok Yoo, Il-Hae Park, Hong-Gil Sun, Jae-Won Kim, Kyeong-Ho Lee, Hum-Dai Park, Hee-Jun Chi. Early fragment removal on *in-vitro* fertilization day 2 significantly improves the subsequent development and clinical outcomes of fragmented human embryos. *Clin Exp Reprod Med* 2018;45(3):122-128.
5. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(2):93-8.
6. Alikani M, Schimmel T, Willadsen SM. Cytoplasmic fragmentation in activated eggs occurs in the cytokinetic phase of the cell cycle, in lieu of normal cytokinesis, and in response to cytoskeletal disorder. *Mol Hum Reprod* 2005;11:335–44.
7. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pflieger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod* 2002;17:2415–8.67.
8. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000;15:427–30.68.
9. Ziebe S, Bangsboll S, Schmidt KLT, Loft A, Lindhard A, Nyboe Andersen A. Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. *Hum Reprod* 2004;19:1457–60.

10. Ziebe S, Lundin K, Janssens R, Helmggaard L, Arce JC. MERIT (Menotrophin vs Recombinant FSH *in-vitro* Fertilisation Trial) Group. Influence of ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patients undergoing IVF. *Hum Reprod* 2007;22:2404–13.
11. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, et al. Differential growth of human embryos *in-vitro*: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril* 2004;82:593–600.100.
12. Browne RW, Shelly WB, Bloom MS, Ocque AJ, Sandler JR, Huddleston HG, et al. Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. *Hum Reprod* 2008;23:1884–94.
13. Kim SM, Kim SK, Jee BC, Kim SH. Effect of Sperm DNA Fragmentation on Embryo Quality in Normal Responder Women in *In-vitro* Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Yonsei Med J.* 2019 May;60(5):461-466.
14. Alikani M. Cytoplasmic fragmentation in human embryos *in-vitro*: implications and the relevance of fragment removal. In: Gardner D, Weissman A, Howles C, Shoham Z, eds. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques, Laboratory and Clinical Perspectives*. London, Martin Dunitz, 2001: 169–82.
15. Alikani M, Cohen J, Tomkin G et al. Human embryo fragmentation *in-vitro* and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999; 71: 836–42.
16. Andres Salumets, Timo Tuuri, Sirpa Mäkinen, Sirpa Vilska, Lea Husu, Ritva Tainio, Anne-Maria Suikkari. Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen–thawed embryo transfer. *Human Reproduction* 2003; 18(9): 1890-1895.
17. M Cristina Magli, Luca Gianaroli, Anna Pia Ferraretti, Michela Lappi, Alessandra Ruberti, and Valeria Farfalli. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril*, 2007; 87(3): 534-541.
18. Hardy K, Stark J, Winston RM. Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. *Biol Reprod* 2003; 68: 1165–9.
19. Stone BA, Greene J, Vargyas JM et al. Embryo fragmentation as a determinant of blastocyst development *in-vitro* and pregnancy outcomes following embryo transfer. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 2014–9.
20. Ebner T, Yaman C, Moser M et al. Embryo fragmentation *in-vitro* and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2001; 76: 281–5.
21. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997;12:1545-9.