

THE RESULTS OF BLASTOCYST FORMATION RATE WHEN INJECTING HIGH DNA FRAGMENTATION INDEX SPERM INTRA-CYTOPLASMIC

Le Ngoc Tue Nhi*, Pham Thai Ha, Doan Xuan Kien, Nguyen Dieu Linh

Nghe An Obstetrics and Pediatrics Hospital - 19 Ton That Tung, Hung Dung Ward, Vinh City, Nghe An Province, Vietnam

Received: 10/03/2025

Revised: 29/03/2025; Accepted: 17/04/2025

ABSTRACT

Objective: To evaluate the results of blastocyst formation rate injecting sperm with high fragmentation index (DFI ≥ 30) incubated with follicular fluid and injected intra-cytoplasmic.

Subjects and methods: A cross-sectional descriptive study was conducted on 1,383 oocytes from 110 couples undergoing in vitro fertilization (IVF) at the Center for Assisted Reproduction and Andrology - Phu Tho Obstetrics & Pediatric Hospital. The fertilization results, embryo formation (Day 3) and blastocyst formation (Day 5 and 6) were compared between the study group (injected high DFI sperm incubated with follicular fluid) and the control group (injected high DFI sperm not incubated with follicular fluid).

Results: The fertilization rate, Day 3 embryo rate, Day 3 embryo rate (grade 1 + grade 2), blastocyst rate and blastocyst rate (grade 1+ grade 2) of the study group compared to the control group showed statistically significant differences: 90.4% vs. 81.6%, $p < 0.05$; 100% vs. 99.2%, $p < 0.05$; 57.5% vs. 50.9%, $p < 0.05$; 65.7% vs. 47.7%, $p < 0.05$; and 63.5% vs. 32.4%, $p < 0.05$, respectively.

Conclusion: The fertilization rate and the blastocyst formation rate in the study group higher the control group, particularly the blastocyst rate (grade 1+ grade 2) in the study group with double for the control group.

Keywords: High sperm DNA fragmentation index, ICSI, blastocyst.

*Corresponding author

Email: lengoctuenhi1001@gmail.com **Phone:** (+84) 326982168 **https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD6.2300**

KẾT QUẢ TẠO PHÔI NANG KHI TIÊM TINH TRÙNG CÓ CHỈ SỐ PHÂN MẢNH CAO Ử VỚI DỊCH NANG TRỨNG VÀO BÀO TƯƠNG NOĂN

Lê Ngọc Tuệ Nhi*, Phạm Thái Hạ, Đoàn Xuân Kiên, Nguyễn Diệu Linh

Bệnh viện Sản Nhi Nghệ An - 19 Tôn Thất Tùng, P. Hưng Dũng, Tp. Vinh, Tỉnh Nghệ An, Việt Nam

Ngày nhận bài: 10/03/2025

Chỉnh sửa ngày: 29/03/2025; Ngày duyệt đăng: 17/04/2025

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá kết quả tạo phôi nang bằng phương pháp tiêm tinh trùng có chỉ số phân mảnh cao ($DFI \geq 30$ - DNA fragmentation Index ≥ 30) được ử với dịch nang trứng vào bào tương noãn.

Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu mô tả cắt ngang thực hiện trên 1383 noãn của 110 cặp bệnh nhân thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản và Nam học - Bệnh viện Sản Nhi tỉnh Phú Thọ. So sánh kết quả thụ tinh, tạo phôi ngày 3 và phôi nang (phôi ngày 5,6) của nhóm nghiên cứu (tiêm tinh trùng có chỉ số phân mảnh cao được ử với dịch nang trứng vào bào tương noãn) và nhóm chứng (tiêm tinh trùng có chỉ số phân mảnh cao không ử với dịch nang trứng vào bào tương noãn).

Kết quả: Tỷ lệ thụ tinh, phôi ngày 3, phôi ngày 3 (loại 1+loại 2), phôi nang, phôi nang (loại 1+loại 2) của nhóm nghiên cứu so với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê lần lượt (90,4% so với 81,6%, $p < 0,05$; 100% so với 99,2%, $p < 0,05$; 57,5% so với 50,9%, $p < 0,05$; 65,7% so với 47,7%, $p < 0,05$; 63,5% so với 32,4%, $p < 0,05$).

Kết luận: Tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ phôi phát triển lên giai đoạn phôi nang của nhóm nghiên cứu cao hơn nhóm chứng, đặc biệt số lượng phôi nang có chất lượng tốt nhiều hơn gần 2 lần so với nhóm chứng.

Từ khóa: Chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng cao, ICSI, phôi nang.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vô sinh là một vấn đề sức khỏe sinh sản cấp thiết và đang có xu hướng gia tăng trong xã hội hiện nay. Theo ghi nhận của y văn thế giới, tỷ lệ vô sinh nam khoảng 30-40%, và cách đây hơn thập kỷ, tỷ lệ nam giới điều trị hiếm muộn có liên quan đến tinh trùng bất thường chiếm 77,3 % [1]. Đây là những con số rất đáng báo động vì tỷ lệ vô sinh đang tăng rất nhanh theo thời gian.

Các trường hợp dị tật của tinh trùng tồn tại trong 30-50% các trường hợp vô sinh ở nam giới [2]. Những bất thường về các chỉ số tinh dịch đồ sẽ ảnh hưởng lên quá trình có thai tự nhiên. Tuy nhiên các tổn thương liên quan đến DNA tinh trùng (được xác định bằng chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng-DFI) có thể là một trong những nguyên nhân dẫn đến thất bại trong điều trị vô sinh. Các nghiên cứu khác nhau đã chỉ ra rằng ở nam giới vô sinh có mức độ phân mảnh của DNA tinh trùng cao hơn so với nhóm sinh sản bình thường [3].

Dịch nang trứng là một phức hợp chất lỏng bao quanh tế bào trứng đang phát triển. Vai trò ban đầu của các

phân tử có trong dịch nang trứng là điều chỉnh sự trưởng thành của tế bào trứng và nang trứng, bảo vệ các tế bào nang trứng khỏi các tổn thương vật lý hoặc oxy hóa. Dịch nang trứng của con người có liên quan đến việc thúc đẩy năng lực tinh trùng, phản ứng acrosome, hóa hướng động và khả năng vận động của tinh trùng [3]. Vì những lý do này, dịch nang trứng thường được sử dụng trong công nghệ hỗ trợ sinh sản để bảo vệ chất lượng tinh trùng. Từ năm 1990, Ghetler và nhóm nghiên cứu của mình đã chứng minh rằng tinh trùng ử với dịch nang trứng giúp tăng tỷ lệ thụ tinh trong IVF truyền thống. Đặc biệt một nghiên cứu gần nhất tại Việt Nam vào năm 2023 chỉ ra rằng kết quả tạo phôi có cải thiện đáng kể khi ử tinh trùng với dịch nang trứng [4]. Tuy nhiên, đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào đánh giá về khả năng tạo phôi cũng như cải thiện hiệu quả điều trị bằng phương pháp ICSI của tinh trùng có chỉ số phân mảnh cao ($DFI \geq 30$) được xử lý với dịch nang trứng. Vì vậy, mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi tiến hành đánh giá chất lượng phôi có được cải thiện sau khi tiêm tinh

*Tác giả liên hệ

Email: lengoctuenhi1001@gmail.com Điện thoại: (+84) 326982168 <https://doi.org/10.52163/ylc.v66iCD6.2300>

trùng có chỉ số phân mảnh cao ử với dịch nang trứng vào bào tương nhằm nâng cao chất lượng trong điều trị vô sinh

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Mẫu tinh trùng, noãn, phôi của 110 cặp vợ chồng thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm tại Phòng Lab - Trung tâm Hỗ trợ sinh sản và Nam học - Bệnh viện Sản Nhi tỉnh Phú Thọ từ tháng 10/2023 đến 12/2024.

2.3. Đối tượng nghiên cứu

110 mẫu tinh trùng, 1383 noãn của 110 cặp bệnh nhân thực hiện IVF tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản và nam học - Bệnh viện Sản Nhi tỉnh Phú Thọ.

Tiêu chuẩn loại trừ: Loại bỏ các mẫu tinh dịch có thể tích <1ml hoặc các mẫu không có hoặc rất ít tinh trùng (Azoospermia). Số lượng noãn trưởng thành nhỏ hơn 6.

2.4. Cỡ mẫu, chọn mẫu

Cỡ mẫu (tính theo cặp vợ chồng) được tính theo công thức:

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{p(1-p)}{d^2}$$

Trong đó:

+ n là cỡ mẫu tối thiểu.

+ $Z_{1-\alpha/2}$ là giá trị từ phân bố chuẩn, được tính dựa trên mức ý nghĩa thống kê ($Z_{1-\alpha/2} = 1,96$ nếu mức ý nghĩa thống kê = 5%).

+ p là tỷ lệ ước đoán (Lấy từ nghiên cứu trước đây hoặc từ nghiên cứu thử nghiệm).

+ d là mức sai số tuyệt đối chấp nhận.

Trong nghiên cứu này, cỡ mẫu được dựa trên kết quả cơ bản với tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi trong nghiên cứu của Sara Sabet và cộng sự (2021) tương ứng là 0.8 và 0.7, $\alpha = 0.05$; $Z_{1-\alpha/2} = 1.96$; $d = 0.09$ đến 0.1 liên quan đến tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ tạo phôi [55]. Áp dụng công thức ta tính được cỡ mẫu nhỏ nhất cần nghiên cứu là 75 mẫu (75 cặp bệnh nhân).

Chúng tôi lấy cỡ mẫu nghiên cứu là 110 cặp bệnh nhân để tăng độ chính xác.

Cách chọn mẫu: chọn mẫu tinh trùng có chỉ số DFI ≥ 30 .

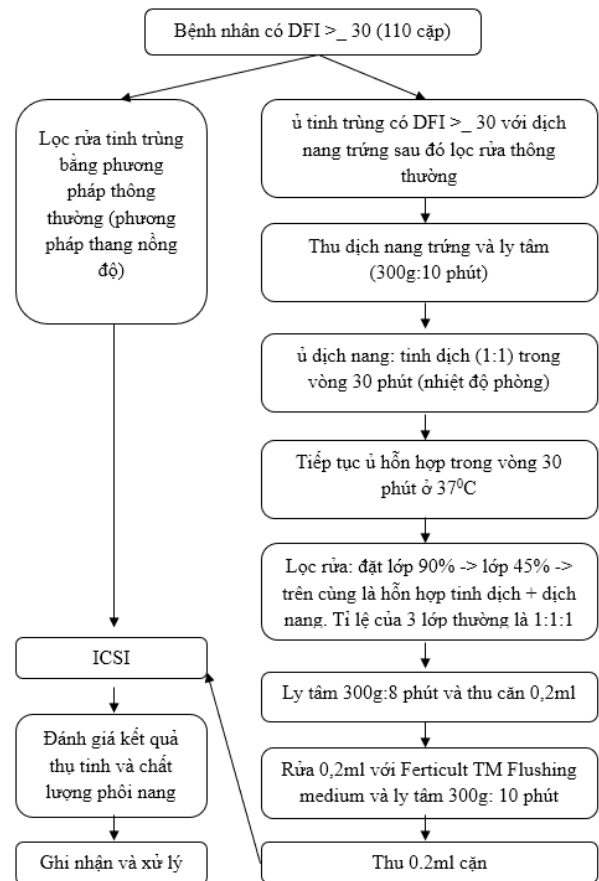
2.5. Các biến số trong nghiên cứu

Các biến số trong nghiên cứu gồm: độ tuổi, số noãn MII, mật độ tinh trùng, tinh trùng di động tiến tới, hình dạng tinh trùng, chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng, phôi

ngày 3 và phôi nang.

2.6. Quy trình nghiên cứu

Quy trình nghiên cứu được thể hiện trong hình 1.



Hình 1. Sơ đồ các bước tiến hành nghiên cứu

2.6.1. Thiết bị, vật tư, hóa chất và mẫu bệnh phẩm

Thiết bị và vật tư

- Holding Pipette 120-35 (Vitrolife-Thụy điển): kim giữ trứng.
- ICSI Pipette (Microtech- Séc): kim tiêm tinh trùng vào bào tương noãn.
- Đĩa nuôi cấy 4 giếng Oosafe (Đan Mạch): đĩa rửa trứng.
- Ống nghiệm tiết trùng 5ml đáy tròn: thu nhận dịch nang và tinh trùng sau rửa.
- Đĩa nuôi cấy Petri IVF 35mm, 60mm, 90mm Oosafe (Đan Mạch): thu nhận noãn, ICSI.
- Tủ nuôi cấy phôi ASTEC.
- Máy ly tâm Hettich (Đức).
- Hệ thống kinh hiển vi đảo ngược vi thao tác OLYMPUS (Nhật Bản).
- Kính hiển vi quang học, kính hiển vi đảo ngược (Nhật Bản).

- Tủ lạnh (Sanyo, Nhật Bản).
- Micropipette các loại (Biohit).

Hóa chất

- Môi trường lọc rửa tinh trùng Sil-Select PlusTM (Fertipro-Bi): Môi trường lọc rửa 45% và 90% để tạo thang nồng độ trong lọc rửa tinh trùng.
- FercultTM flushing medium: môi trường rửa tinh trùng.
- Continuous Single Culture-NX Code 90168 (USA): môi trường nuôi phôi liên tục.
- PVP Solution with HSA 10% (Vitrolife-Thuy điển): môi trường giảm tốc độ tinh trùng.
- Hyaluronidase (Vitrolife-Thuy): môi trường tách trứng.
- Dầu phủ Ovoid (Vitrolife-Thuy Điển).
- Ống ly tâm đáy nhọn 15ml (Hãng sx: Corning-(Brand: Falcon).

Mẫu bệnh phẩm

Mỗi cặp vợ chồng trong số 110 cặp vợ chồng có DFI $\geq$ 30% sẽ được thu thập.

- Dịch nang trứng và noãn từ cơ thể người vợ khi chọc trứng.
- Tinh dịch của người chồng đã có kết quả DFI $\geq$ 30% bằng phương pháp SCD.

2.6.2. Quy trình thực hiện

a. Phân loại mẫu tinh dịch có DFI $\geq$ 30%

Sau khi thu mẫu tinh dịch từ các cặp vợ chồng làm TTON, chuyên viên phôi học sẽ đánh giá tinh dịch độ và kiểm tra chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DFI) bằng phương pháp SCD. Các mẫu có DFI $\geq$ 30% sẽ được nghiên cứu tiếp.

b. Chuẩn bị dịch nang trứng:



Hình 2. Chuẩn bị dịch nang trứng

Dịch nang trứng được thu trong quá trình nhặt trứng. Chỉ sử dụng ống chứa dịch sạch, màu vàng trong suốt, tránh ống nhiễm hồng cầu hoặc tạp dịch khác. Dịch thu được ly tâm 300g trong 10 phút để loại bỏ cặn.

c. Ủ tinh dịch với dịch nang trứng

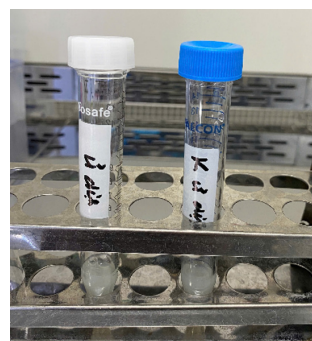
Sau khi xử lý tinh dịch và dịch nang, ủ 1 ml tinh dịch vào 1 ml dịch nang trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp

theo, ủ hỗn hợp trong tủ ấm 37°C thêm 30 phút. Sau đó hỗn hợp hỗn hợp này sẽ được mang đi lọc rửa.

d. Lọc rửa

Mẫu tinh dịch DFI $\geq$ 30% được chia thành 2 nhóm:

- Mẫu đối chứng: Lọc rửa với tỉ lệ tinh trùng và môi trường 90% :45% là 1:1. Sau đó, ly tâm 15 phút ở 300g, bỏ dịch nổi, thu cặn và cho vào môi trường rửa và ly tâm 300g trong 10 phút, giữ lại 0,3-0,5 ml tinh trùng cho quy trình ICSI.
- Mẫu ủ với dịch nang trứng: Thực hiện lọc rửa đặt lớp 90-> lớp 45 và trên cùng là lớp hỗn hợp sau đó ly tâm 300g trong 15 phút-> bỏ dịch nổi, thu cặn và cho vào môi trường rửa sau đó ly tâm 300g trong 10 phút, giữ lại 0,3-0,5 ml tinh trùng cho quy trình ICSI.



Hình 3. Lọc rửa tinh trùng

e. ICSI

Toàn bộ noãn sau khi thu được sẽ được ủ và rửa để loại bỏ cumulus trước khi thực hiện ICSI. Số noãn được chia đều vào hai nhóm: nhóm ICSI sử dụng mẫu tinh dịch của chồng đã được lọc bằng thang nồng độ và nhóm ICSI sử dụng mẫu tinh dịch của chồng đã ủ với dịch nang trứng.

f. Đánh giá thụ tinh và chất lượng phôi nang

Sau 16-20 giờ ICSI sẽ kiểm tra kết quả thụ tinh (ngày 1) và sau 116 $\pm$ 2 giờ sẽ kiểm tra hình thành phôi nang (ngày 5, ngày 6, ngày 7) theo tiêu chuẩn của tổ chức Alpha [21]. Số liệu được phân tích và xử lý bằng phần mềm SPSS.

2.7. Xử lý và phân tích số liệu

Dữ liệu thu được sẽ được xử lý bằng phần mềm SPSS.

2.8. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện dựa trên sự đồng ý của bệnh nhân và lãnh đạo Trung tâm Hỗ trợ Sinh sản và Nam học - Bệnh viện Sản Nhi tỉnh Phú Thọ. Danh sách bệnh nhân cũng như toàn bộ thông tin của người bệnh đều được giữ bí mật. Nghiên cứu chỉ nhằm mục đích làm tăng tỉ lệ thành công ở những bệnh nhân IVF, ngoài ra không vì bất kì mục đích nào khác.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Đặc điểm của nhóm đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 110 cặp bệnh nhân thực hiện IVF tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản và nam học - Bệnh viện Sản Nhi tỉnh Phú Thọ trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu giữa 2 nhóm

Đặc điểm	Thông số
Số lượng (cặp)	110
Tuổi vợ (tuổi)	34,7 ± 5,2
Tuổi chồng (tuổi)	38,7 ± 5,9
Số noãn trưởng thành (MII) (noãn)	1383
Số noãn trưởng thành (MII) trung bình (noãn)	12,6 ± 7,6
Mật độ tinh trùng (triệu/ml)	41,3 ± 7,3
Di động tiến tới (%)	18,5 ± 3,5
Hình dạng tinh trùng (%)	1,03 ± 0,5
DFI (%)	35,3 ± 6,6

Theo số liệu ở bảng 1, với độ tuổi trung bình của chồng là 38,7 tuổi, của vợ là 34,7 tuổi. Các chỉ số tinh dịch đồ bao gồm mật độ trung bình 41,4 (triệu/ml), di động tiến tới 18,5%, hình dạng tinh trùng 1,03% và chỉ số phân mảnh tinh trùng là 35,3% nhưng có sự dao động từ 30-77%. Do vậy, chất lượng tinh trùng kém có thể là nguyên nhân gây ảnh hưởng đến chất lượng tạo phôi đặc biệt là phôi nang.

Số lượng noãn MII nghiên cứu là 1383 noãn trong đó số noãn trung bình là 12,6 noãn. Noãn được chia đều, ngẫu nhiên vào hai nhóm gồm 770 noãn trong nhóm nghiên cứu và 768 noãn trong nhóm chứng.

3.2. So sánh tỷ lệ thụ tinh giữa nhóm nghiên cứu và nhóm chứng

Kết quả nghiên cứu trên 110 cặp bệnh nhân cho tỷ lệ thụ tinh ở nhóm nghiên cứu cao hơn rõ rệt so với nhóm chứng có ý nghĩa thống kê 80,7% so với 71,6%; $p < 0,05$) được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Tỷ lệ thụ tinh giữa 2 nhóm

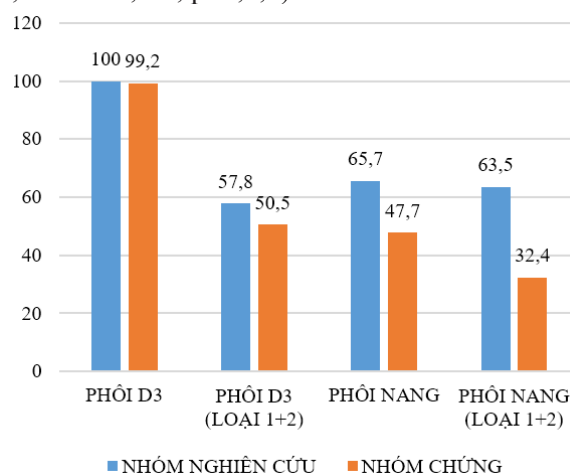
	Nhóm nghiên cứu	Nhóm chứng	Giá trị p
Tỷ lệ thụ tinh	80,7	71,6	$p < 0,05$

Với kết quả ở bảng 2, nhận thấy rằng việc ủ tinh trùng có chỉ số phân mảnh cao với dịch nang trứng có cải

thiện lên kết quả thụ tinh của bệnh nhân, từ đó làm tăng số lượng tạo phôi.

3.3. Tỷ lệ tạo phôi giữa nhóm nghiên cứu và nhóm chứng

Tỷ lệ lên phôi D3 của hai nhóm không có sự khác biệt đáng kể (100% so với 99,2 $p = 0,084$). Tuy nhiên chất lượng phôi D3 (loại 1 và loại 2) lại có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (57,8% so với 50,5%, $p = 0,042$). Đối với tỷ lệ tạo thành phôi nang được cải thiện đáng kể ở nhóm nghiên cứu so với nhóm đối chứng (65,7% và 47,7%, $p < 0,05$). Đặc biệt, ở nhóm nghiên cứu có tỷ lệ phôi nang loại 1 và loại 2 cao hơn gần 2 lần so với nhóm chứng (63,5% và 32,4%, $p < 0,05$).

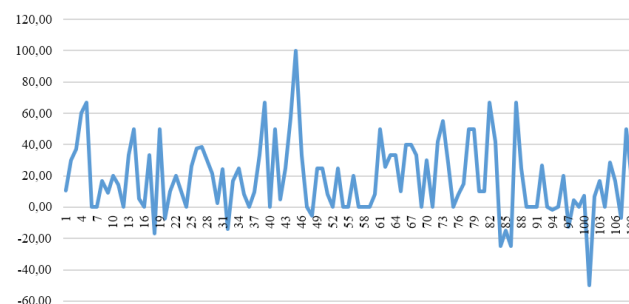


Hình 4. Tỷ lệ tạo phôi của nghiên cứu

Từ Hình 4 cho thấy việc ủ tinh trùng có chỉ số phân mảnh cao với dịch nang trứng đem lại hiệu quả nhất định trong kết quả tạo phôi, đặc biệt là nhóm phôi nang loại 1 và loại 2. Kết quả thực hiện IVF tạo phôi nang loại 1 và loại 2 trên nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với hai nghiên cứu của Đỗ Mạnh Hưng và cộng sự (2023); Jang và cộng sự (2022).

3.4. Tỷ lệ chênh lệch tạo phôi nang giữa nhóm nghiên cứu và nhóm chứng

Trong 110 cặp bệnh nhân tham gia nghiên cứu, chúng tôi đã thấy có sự chênh lệch về tỷ lệ tạo phôi nang giữa hai nhóm được thể hiện ở Hình 5.



Hình 5. Chênh lệch tỷ lệ phôi nang giữa hai nhóm

Kết quả cho thấy, từ nhóm chứng có tỷ lệ tạo phôi nang cao hơn nhóm nghiên cứu: 8 cặp từ 0-25% (chiếm 7,27%); 3 cặp từ 25-50% (chiếm 2,73%) và không có cặp nào trên 50%. Trong khi đó nhóm nghiên cứu có

tỷ lệ tạo phôi nang cao hơn so với nhóm chứng: 31 cặp từ 0-25% (chiếm 28,2%), 35 cặp từ 25-50% (chiếm 31,8%) và 8 cặp trên 50% (chiếm 7,27%). Số cặp còn lại có tỷ lệ tạo thành phôi nang giữa hai nhóm là bằng nhau, bao gồm 25 cặp (chiếm 22,73%).

4. KẾT LUẬN

Với những bước đầu của nhóm nghiên cứu đã mang lại những hiệu quả đáng kể đối với bệnh nhân thực hiện IVF, tiết kiệm chi phí có thể áp dụng nhằm cải thiện hiệu quả tạo phôi đặc biệt đối với nhóm bệnh nhân có chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng cao ($DFI \geq 30$).

Đã xác định tỷ lệ thụ tinh, số phôi phát triển lên giai đoạn phôi nang của nhóm ủ tinh trùng với dịch nang trứng cao hơn nhóm không ủ tinh trùng với dịch nang trứng có ý nghĩa thống kê lần lượt (80,7% so với 71,6%, $p < 0,05$; 65,7% so với 47,7%, $p < 0,05$). Đặc biệt, số lượng phôi nang chất lượng tốt nhiều hơn gần 2 lần so với nhóm chứng (63,5% so với 32,4 %, $p < 0,05$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC, Ko E, Ramasamy R, Zini A. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl Androl Urol*. 2016; 5(6):935-950.
- [2] Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*. 2003 Oct; 80(4):895-902.
- [3] Alvarez JG. DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility. *Minerva Ginecol*, 2003 Jun; 55(3):233-9.
- [4] TS. Bùi Mạnh Hưng, Nguyễn Thị Thuỷ (2023). Hiệu quả của việc ủ tinh trùng với dịch nang trứng lên kết quả tạo phôi bằng phương pháp ICSI. Hội nghị phôi học lâm sàng lần 4, Thành phố Hồ Chí Minh.
- [5] ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine., "The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators," *Reprod Biomed Online*, vol. 35, no. 5, pp. 494-510, 2017.
- [6] H. Zhao, W. Tao, M. Li, H. Liu, K. Wu, and S. Ma, "Comparison of two protocols of blastocyst biopsy submitted to preimplantation genetic testing for aneuploidies: a randomized controlled trial," *Arch Gynecol Obstet*, vol. 299, no. 5, p. 1487–1493, 2019.
- [7] Sankar Kumar Das, Krishna Kalita, "Effect of sperm DNA fragmentation on blastocyst formation rate and subsequent IVF outcome", *International Journal Reprod Contracept Obstet Gynecol*. 2022 Feb;11(2):385-389