

TẠP CHÍ PHỤ SẢN

TẬP 17 (01), 09 - 2019

JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY



ẤN BẢN CHÍNH THỨC CỦA HỘI PHỤ SẢN VIỆT NAM

Official publication of Vietnam Association of Gynecology and Obstetrics

MỤC LỤC

TỔNG QUAN

06 - 12 CẬP NHẬP XỬ TRÍ U XƠ CƠ TỬ CUNG DỰA TRÊN BẢNG CHỨNG

Lê Minh Tâm, Võ Văn Khoa, Phan Thị Minh Thu

13 - 16 CẬP NHẬT ĐIỀU TRỊ TRANEXAMIC ACID TRONG BẢNG HUYẾT SAU SINH

Nguyễn Mai An, Phạm Thị Minh Trang

17 - 21 HỖ TRỢ SINH SẢN DƯỚI GÓC NHÌN KINH TẾ SỨC KHỎE: CHI PHÍ VÀ KHẢ NĂNG TIẾP CẬN ĐIỀU TRỊ

Nguyễn Thị Phương Dung

Nguyễn Xuân Mnh, Nguyễn Văn Sáu, Lữ Thị Thùy Quyên, Đinh Thị Mỹ Hòa, Trương Thùy Dương, Trần Thị Bích Khuê

36 - 41 CHẨN ĐOÁN TRƯỚC SINH BỆNH THALASSEMIA TẠI BỆNH VIỆN PHỤ SẢN TRUNG ƯƠNG

Đặng Thị Hồng Thiện, Lê Hoài Chương, Hoàng Thị Ngọc Lan

42 - 47 PHẪU THUẬT NỘI SOI U BÙỒNG TRỨNG Ở TRÉ DƯỚI 15 TUỔI TẠI BỆNH VIỆN PHỤ SẢN TRUNG ƯƠNG

Vũ Bá Quyết, Ngô Phan Thanh Thủy

48 - 53 RỐI LOẠN CHUYỂN HÓA LIPID Ở BỆNH NHÂN VÔ SINH CÓ HỘI CHỨNG BÙỒNG TRỨNG ĐA NANG

Lê Quỳnh Trang, Lê Minh Tâm

NGHIÊN CỨU

22 - 27 ĐÁNH GIÁ GIÁ TRỊ CỦA MPI TRONG TIỀN LƯỢNG KẾT CỤC THAI KỲ THAI KÉM PHÁT TRIỂN

Nguyễn Trần Thảo Nguyên, Võ Văn Đức, Cao Ngọc Thành

28 - 35 NGHIÊN CỨU HIỆU QUẢ ĐẶT BÓNG CHÈN LÒNG TỬ CUNG BẰNG SONDÉ FOLEY ĐIỀU TRỊ BẢNG HUYẾT SAU SINH

Lê Cao Tuấn, Nguyễn Đình Tuyền, Đặng Ngọc Thuận,

54 - 61 MỘT SỐ YẾU TỐ LIÊN QUAN PHÂN MẢNH DNA TINH TRÙNG

Lê Minh Tâm, Trần Thị Như Quỳnh, Lê Đình Dương, Cao Ngọc Thành

62 - 67 MỐI TƯƠNG QUAN CỦA CHỈ SỐ PHÂN MẢNH DNA TINH TRÙNG VÀ KẾT QUẢ TIÊM TINH TRÙNG VÀO BÀO TƯƠNG NOÃN

Nguyễn Thị Quỳnh Tiên, Mã Phạm Quế Mai, Dương Nguyễn Duy Tuyền, Nguyễn Minh Tài Lộc, Nguyễn Trương Thái Hà

68 - 74 KẾT QUẢ THỤ TINH ỚNG NGHỆM CỦA NHÓM BỆNH NHÂN “TIỀN LƯỢNG THẤP” THEO PHÂN LOẠI POSEIDON

Lê Long Hồ, Phạm Dương Toàn, Vương Thị Ngọc Lan

75 - 79 MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA ĐA HÌNH GEN THỤ THỂ FSH VÀ ĐÁP ỨNG KÍCH THÍCH BUỒNG TRỨNG CẬN TỐI ƯU TRÊN NHÓM PHỤ NỮ THỰC HIỆN IVF TẠI VIỆT NAM

Mã Phạm Quế Mai, Lê Long Hồ, Phạm Thiếu Quân, Hồ Mạnh Tường, Vương Thị Ngọc Lan

80 - 84 HIỆU QUẢ NUÔI CẤY PHÔI GIỮA HAI HỆ THỐNG TỬ CẤY BENCHTOP CÓ HOẶC KHÔNG SỬ DỤNG KHÍ TRỘN: MỘT NGHIÊN CỨU CHIA NOÃN

Hà Thị Diễm Uyên, Trần Tú Cầm, Phạm Thiếu Quân, Huỳnh Gia Bảo, Hồ Mạnh Tường

85 - 89 SO SÁNH TỈ LỆ TRẺ SINH SỐNG GIỮA CHUYỂN PHÔI PHÂN CHIA VỚI PHÔI NÉN TẠI THỜI ĐIỂM 66 ± 2 GIỜ SAU ICSI SỬ DỤNG HỆ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY ĐƠN BƯỚC Ở BỆNH NHÂN TTTON

Luu Thị Minh Tâm, Trần Thị Thủy An, Nguyễn Ngọc Quỳnh, Trần Tú Cầm, Phạm Dương Toàn, Huỳnh Gia Bảo, Hồ Mạnh Tường

BÁO CÁO TRƯỜNG HỢP

90 - 96 CHẨN ĐOÁN ĐỘT BIẾN DI TRUYỀN ĐƠN GEN GIAI ĐOẠN PHÔI TIỀN LÀM TỔ (PGT-M) TRONG LOẠI TRỪ GEN BỆNH THALASSEMIA: BÁO CÁO LOẠT CA

Đặng Quang Vinh, Nguyễn Minh Tuấn, Lưu Thị Minh Tâm, Phạm Thiếu Quân, Trần Tú Cầm, Huỳnh Gia Bảo, Hồ Mạnh Tường

97 - 99 NHẬN MỘT TRƯỜNG HỢP GIỮ THAI CÒN LẠI THÀNH CÔNG SAU KHI ĐÃ ĐỂ MỘT THAI TRONG SONG THAI

Vũ Bá Quyết, Đặng Quang Hùng

MỘT SỐ YẾU TỐ LIÊN QUAN PHÂN MẢNH DNA TINH TRÙNG

Lê Minh Tâm, Trần Thị Như Quỳnh, Lê Đình Dương, Cao Ngọc Thành
Bệnh viện Đại học Y Dược Huế

Từ khóa: Chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng, DFI, SDC, phân tích tinh dịch.
Keywords: sperm DNA fragmentation index, DFI, SDC, semen analysis.

Tóm tắt

Mục tiêu: Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục đích tìm hiểu một số yếu tố liên quan đến chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng.

Phương pháp: Nghiên cứu tiến hành tại Trung tâm Nội tiết sinh sản và Vô sinh - Bệnh viện Đại học Y Dược Huế, trên những trường hợp nam giới các cặp vợ chồng vô sinh đồng ý tham gia vào nghiên cứu. Tiến hành thu thập thông tin hành chính, tiền sử bệnh tật, thói quen sử dụng thuốc lá, rượu bia; thăm khám lâm sàng và cận lâm sàng bao gồm phân tích tinh dịch và xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng bằng phương pháp SDC. Dựa vào chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DFI) chia thành 2 nhóm: $DFI \geq 30\%$ và $DFI < 30\%$, phân tích tìm mối liên quan giữa DFI và các yếu tố: tuổi, hút thuốc lá, rượu bia và các thông số mật độ, di động tiến tới, bất thường hình thái, bất thường đầu và cổ - đuôi trong phân tích tinh dịch.

Kết quả: Có 390 người đàn ông trong các cặp vợ chồng vô sinh đầy đủ các tiêu chuẩn được lựa chọn vào mẫu nghiên cứu. Không có mối tương quan nào giữa DFI với tuổi, sức sống và bất thường đuôi - cổ của tinh trùng. Trong khi đó, có mối tương quan thuận của DFI với bất thường hình thái tinh trùng đặc biệt là bất thường đầu và mối tương quan nghịch của DFI với mật độ và di động tiến tới ($p < 0,05$).

Kết luận: Ngoài phân tích tinh dịch là xét nghiệm tiêu chuẩn để đánh giá chất lượng tinh trùng ở nam giới hiếm muộn, xét nghiệm chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng cho thấy vai trò bổ sung cho chẩn đoán vô sinh nam.

Từ khóa: Chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng, DFI, SDC, phân tích tinh dịch.

Abstract

Objectives: The study was conducted to determine factors related to sperm DNA fragmentation index.

Materials and methods: The cross-sectional study, conducted at Hue Center of Reproductive Endocrinology and Infertility - Hue University Hospital, on cases of male in infertile couples and agreed to participate

Tác giả liên hệ (Corresponding author):
Lê Minh Tâm, email:
lemintam@huemed-univ.edu.vn
Ngày nhận bài (received): 10/08/2018
Ngày phản biện đánh giá bài báo (revised):
30/08/2019
Ngày bài báo được chấp nhận đăng
(accepted): 01/09/2019

in. Collecting administrative information, medical history, smoking and alcohol consumption; clinical and subclinical examination including semen analysis and sperm DNA fragmentation were tested by SDC method. Based on sperm DNA fragmentation index (DFI), patients were divided into 2 groups: $DFI \geq 30\%$ and $DFI < 30\%$ to find the relationship between DFI and factors such as: age, smoking, alcohol and other semen parameters: progressive motility, abnormal morphology, head and neck - tail abnormality.

Results: There are 390 men in infertile couples were selected for the study. There is no correlation between DFI and men's age, vitality and tail-neck abnormality. Meanwhile, there is a positive correlation between DFI and abnormal morphology, especially abnormal head and negative correlation between DFI and progressive mobility, between DFI and concentration ($p < 0.05$).

Conclusion: In addition to semen analysis, which is a standard test to discovery the sperm quality in infertile men, sperm DNA fragmentation test show as an additional role in the infertility diagnosis.

Key words: sperm DNA fragmentation index, DFI, SDC, semen analysis.

1. Đặt vấn đề

Thành công của thai kỳ chịu ảnh hưởng của cả nam và nữ. Trong tất cả các nguyên nhân gây vô sinh, gần 50% là do yếu tố vô sinh nam với vai trò là một yếu tố đơn lẻ hoặc kết hợp với yếu tố nữ (3), (46). Vô sinh nam được xác định bởi chất lượng của tinh trùng, ảnh hưởng đến khả năng thụ tinh. Trong các trường hợp vô sinh, phân tích tinh dịch đánh giá nồng độ, khả năng vận động và hình thái tinh trùng được thực hiện như một công cụ chẩn đoán tiêu chuẩn để đánh giá chất lượng tinh trùng (WHO, 2010) (47). Năm 1991, đã có báo cáo rằng hình thái tinh trùng bất thường không chỉ ảnh hưởng đến tỷ lệ thụ tinh thành công và tỷ lệ mang thai trong mỗi chu kỳ mà còn làm tăng nguy cơ sảy thai, ngay cả khi chuyển phôi thành công thông qua chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) (23).

Năm 1993, Halliwell B đề cập đến vai trò của các stress oxy hóa (OS) – sự mất cân bằng trạng thái oxy hóa của cơ thể, gây ra do nồng độ quá cao của chất oxy hóa hoặc nồng độ quá thấp của chất chống oxy hóa. Các gốc oxy hóa phản ứng (ROS) được sản xuất bởi các tế bào tinh trùng nhằm tập hợp tinh trùng, điều hòa sự trưởng thành của tinh trùng và tăng cường đường truyền tín hiệu di động. Tuy nhiên, nồng độ cao ROS có thể tác dụng ngược lên chức năng tinh trùng, dẫn đến vô sinh.

Tăng DFI, tức là tăng tỷ lệ đứt gãy DNA tinh trùng chính là dấu hiệu của mức ROS cao trong tinh dịch (10). Khi nồng độ ROS tăng cao, tinh trùng lại dễ bị tổn thương bởi OS do mất cân bằng quá trình oxy hóa – khử. Năm 2006, Agarwal A và cộng sự đã so sánh nồng độ ROS trong tinh dịch ở những người đàn ông bình thường với những người đàn ông vô sinh, kết quả nồng độ ROS cao có ý nghĩa (4). Năm 2016, SDF đã được AUA-Hiệp hội niệu học Hoa Kỳ và Hiệp hội châu Âu đưa vào hướng dẫn đối với vô sinh nam (21).

Sự phân mảnh DNA được biểu thị bằng chỉ số phân mảnh DNA (DFI). Tỷ lệ phân mảnh DNA thường tương quan với các thông số phân tích tinh dịch thông qua DFI bất thường cao ($> 30\%$) và có thể được tìm thấy ở 8% nam giới vô sinh với phân tích tinh dịch bình thường, cho thấy vai trò bổ trợ cho phân tích tinh dịch chuẩn (27). Một nghiên cứu khác của Bungum và cộng sự vào năm 2011 đã ước tính rằng 40% các trường hợp vô sinh không rõ nguyên nhân có thể liên quan đến sự gia tăng đứt gãy DNA và đề xuất phương án điều trị đối với bệnh nhân có DFI $> 30\%$ chuyển trực tiếp IVF/ICSI (11). Trong các nghiên cứu về tỷ lệ mang thai tự nhiên được phân tầng theo DFI, tỷ lệ thụ thai thấp hơn, tăng nguy cơ sảy thai hoặc bệnh

lý bào thai có ý nghĩa thống kê ở những cặp vợ chồng có DFI tăng (5).

Trong những năm gần đây, một số xét nghiệm đã được giới thiệu để đánh giá cấu trúc nhiễm sắc thể của tinh trùng, bao gồm xét nghiệm TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling), xét nghiệm Comet (Điện di gel đơn), xét nghiệm AO (Acridine Orange), CMA3 (Chromomycin A3), xét nghiệm SCSA và xét nghiệm SCD (Sperm chromatindispertion -phân tán chất nhuộm của tinh trùng) (16), (42). Xét nghiệm SCD dựa trên nguyên tắc tinh trùng có DNA bị phân mảnh không tạo ra quang sáng đặc trưng của các vòng DNA phân tán (18). Ngược lại, tinh trùng không có sự phân mảnh DNA sẽ giải phóng DNA tạo ra các quang sáng lớn hoặc các tinh trùng ít phân mảnh tạo ra các quang sáng trung bình. Tinh trùng có đứt gãy DNA xảy ra quá trình khử protein trong nhân của tế bào tinh trùng bởi acid biến tính và ly giải trong dung dịch tạo ra quang sáng halo nhỏ hoặc không có (quang sáng phát ra ở đầu tinh trùng). Ngược lại, các tinh trùng không có sự phân mảnh DNA sẽ không xảy ra quá trình khử protein trong nhân tế bào, các DNA được giải phóng và tạo ra các quang sáng halo lớn hoặc trung bình khi bắt màu thuốc nhuộm (41).

Bằng cách phân tích tinh dịch thông thường, các thông số bình thường, bao gồm nồng độ, khả năng vận động và hình thái tinh trùng, không đảm bảo DNA tinh trùng bình thường. Tuy nhiên, thụ tinh vẫn có thể xảy ra ngay cả với DNA bị đứt gãy, ảnh hưởng tiêu cực đến kết quả mang thai, gia tăng tỷ lệ sảy thai liên tiếp. Xét nghiệm sự phân mảnh DNA tinh trùng là công cụ cần thiết bổ sung chẩn đoán về tình trạng giao tử của nam giới (1). Mục đích bài báo này nhằm tìm hiểu một số yếu tố liên quan đến kết quả phân mảnh DNA tinh trùng ở những trường hợp vô sinh nam.

2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang được thực hiện tại Trung tâm Nội tiết sinh sản và Vô sinh, Đại học Y Dược Huế từ tháng 12 năm 2017 đến tháng 3 năm 2019. Tiêu chí bao gồm là nam giới từ các cặp vợ chồng vô sinh được chẩn đoán vô sinh theo

tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới. (WHO) với phân tích tinh dịch và kết quả xét nghiệm đứt gãy DNA tinh trùng thông qua test halosperm. Tiêu chí loại trừ bao gồm bất kỳ trường hợp nào không thể xuất tinh, tinh trùng từ bảo quản lạnh hoặc phẫu thuật, bệnh nhân có số lượng tinh trùng cực thấp (dưới 1 triệu / mL) và trường hợp nam giới xét nghiệm không tìm thấy tinh trùng trong tinh dịch (azoospermia). Các trường hợp bị nhiễm trùng nói chung hoặc nhiễm trùng niệu sinh dục, với xuất tinh ngược, cũng bị loại khỏi nghiên cứu. Nghiên cứu được xét duyệt thông qua hội đồng đạo đức của trường Đại học Y Dược Huế.

Tiếp cận lâm sàng

Thông tin chung được ghi nhận liên quan đến tuổi, nghề nghiệp, địa lý, thời gian vô sinh, loại vô sinh, tiền sử bệnh nội khoa hoặc phẫu thuật, hút thuốc và uống rượu. Kiểm tra thể chất được thực hiện để đo chỉ số BMI, vòng eo, vòng hông, kiểm tra bộ phận sinh dục nam liên quan đến bất kỳ bất thường nào ở dương vật, bìu và tinh hoàn.

Quy trình thí nghiệm

Phân tích tinh dịch

Mẫu tinh dịch được thu thập và phân tích theo tiêu chuẩn của WHO năm 2010. Kiểm tra bằng kính hiển vi về khả năng di chuyển của tinh trùng, sức sống, mật độ và hình thái tinh trùng.

a. Độ di động của tinh trùng: Thông số vận động của tinh trùng được phân tích bằng cách đếm thủ công dưới kính hiển vi tương phản (Primo Star, Zeiss, Đức) với độ phóng đại tổng cộng 400 lần. Khả năng vận động của tinh trùng có hai loại: vận động tiến tới và vận động không tiến tới. Trong nghiên cứu này, sự vận động tiến tới của 200 tinh trùng đã được đánh giá.

b. Sức sống tinh trùng: Thông số sức sống được đánh giá bằng kỹ thuật eosin dưới kính hiển vi tương phản (Primo Star, Zeiss, Đức) với độ phóng đại 400 lần theo khuyến nghị của WHO. Hai trăm tế bào đã được tính ngay sau khi hóa lỏng các mẫu tinh dịch và phần trăm các tế bào khả thi đã được tính toán.

c. Hình thái tinh trùng: Thông số này được ước tính bằng nhuộm Giemsa. Hình thái của hình dạng và kích thước đầu tinh trùng, vùng acrosomal, cổ tinh trùng, trung gian, đuôi và giọt tế bào chất được xác định dưới kính hiển vi (Zeiss, Đức) với

độ phóng đại 1000 lần, theo ấn bản thứ 5 của hướng dẫn của WHO. Ít nhất 200 tinh trùng đã được tính để tính tỷ lệ phần trăm của cả hình thái bình thường và bất thường.

Kiểm tra phân mảnh DNA (test SCD)

Tất cả các mẫu tinh dịch được phân tích bằng xét nghiệm Sperm chromatindispertion (SCD) dựa trên quy trình biến tính DNA loại bỏ các protein có trong tinh trùng. Bằng cách này, các tinh trùng bình thường tạo ra quầng sáng được hình thành bởi các vòng DNA ở đầu tinh trùng, không có ở những người có DNA bị đứt gãy, test phân mảnh được thực hiện:

Tinh dịch được pha loãng trong môi trường nuôi cấy để thu được nồng độ tối đa 20 triệu tinh trùng / ml. Lấy 1 lượng tinh dịch 0,2 ml pha loãng trong môi trường agar để thu được nồng độ tinh trùng dao động trong khoảng từ 5 đến 10 triệu / ml sau đó đặt lên tiêu bản. Tiêu bản có tinh trùng được ủ trong dung dịch biến tính axit trong 7 phút (dung dịch AD-acid denudation). Tiếp tục ủ trong dung dịch LS ly giải trong 25 phút. Quá trình loại bỏ nước trong dung dịch bằng etanol 70%, 90% và 100% (mỗi lần 2 phút) và để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng, nhuộm mẫu và đánh giá. Mỗi slide được kiểm tra dưới kính hiển vi ánh sáng ở độ phóng đại x 100 và tinh trùng được ghi nhận độ phân mảnh DNA.

Tinh trùng không có DNA bị phân mảnh tạo ra quầng sáng của DNA phân tán. Các quầng sáng tương ứng với các vòng DNA giãn ra gắn liền với cấu trúc của nhân bên trong, tinh trùng với DNA phân mảnh tạo ra các DNA phân tán nhỏ hoặc không có. Có 5 đánh giá đứt gãy DNA tinh trùng bao gồm:

1. Tế bào tinh trùng có quầng sáng lớn (độ dày bằng hoặc lớn hơn chiều dài đường kính)
2. Tế bào tinh trùng có halos trung bình (độ dày nhỏ hơn chiều dài đường kính nhỏ và lớn hơn 1/3 đường kính nhỏ)
3. Tế bào tinh trùng có quầng nhỏ (độ dày bằng hoặc nhỏ hơn 1/3 đường kính nhỏ)
4. Tinh trùng không có quầng sáng
5. Tế bào tinh trùng thoái hóa

Tổng số 500 tinh trùng đã được đếm khi đánh giá phân mảnh DNA sau đó tính chỉ số phân mảnh DNA (DFI) theo công thức;

$$-DFI \text{ (DNA fragmentation index)} = \frac{TT \text{ of halo white} / TT \text{ of halo} / TT \text{ of halo black}}{\text{Tổng số tinh trùng được}} \times 100\%$$

Đánh giá chia thành hai nhóm liên quan đến giá trị DFI. Chúng tôi đã chọn ngưỡng DFI ở mức 30% để phân biệt giữa hai nhóm: nhóm DFI \geq 30% và nhóm DFI $<$ 30%. Ngưỡng này được sử dụng bởi một số tác giả qua nghiên cứu (Sivanarayana T, 2014), (Venkatesh S, 2011).

Xử lý số liệu

Tất cả các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm SPSS (phiên bản 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, US). Tất cả dữ liệu số được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn. Các tần số được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm so sánh các giá trị trung bình giữa hai nhóm được thực hiện bằng phân tích kiểm tra phương sai. Sự kết hợp của các tham số tiêu chuẩn và DFI được đo bằng hệ số tương quan Pearson (r). Độ chênh lệch giữa các giá trị được coi là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. Kết quả

Tổng cộng có 390 người đàn ông trong các cặp vợ chồng vô sinh đã được lựa chọn vào nhóm nghiên cứu. Bảng 1 cho thấy các đặc điểm chung

Bảng 1. Thông tin tổng quát nhóm nghiên cứu và chỉ số đứt gãy DNA tinh trùng

Yếu tố	Tổng	Mean \pm SD	DFI (%) median (IQR)	Giá trị p
Tuổi				0.130
≥ 35	195 (50.0)	24.21 \pm 17.59	19.4 (12.2 - 31.8)	
< 35	195 (50.0)	21.52 \pm 17.38	16.0 (9.6 - 29.4)	
Phân loại vô sinh				0.397
Nguyên phát	257 (65.9)	23.41 \pm 17.99	18.6 (10.6 - 31.4)	
Thứ phát	133 (34.1)	21.82 \pm 16.57	16.6 (10.2 - 28.2)	
Thời gian vô sinh				0.846
> 3 năm	192 (49.2)	23.04 \pm 17.44	17.4 (10.9 - 29.4)	
≤ 3 năm	198 (50.8)	22.70 \pm 17.62	18.1 (10.2 - 30.4)	
BMI (kg/m²)				0.815
< 18.5	10 (2.6)	21.06 \pm 12.58	15.8 (9.8 - 29.6)	
18.5 - 22.9	173 (44.4)	22.16 \pm 18.36	16.2 (9.8 - 26.4)	
23 - 24.9	94 (24.1)	22.88 \pm 16.53	17.4 (11.2 - 33.4)	
≥ 25	113 (29.0)	24.10 \pm 17.46	19.4 (13.4 - 31.8)	
Địa dư				0.900
Thành thị	165 (42.3)	23.00 \pm 15.76	19.2 (12.4 - 30.4)	
Nông thôn	225 (57.7)	22.77 \pm 18.72	16.6 (10.02 - 29.8)	
Hút thuốc lá				0.364
Có	150 (38.5)	23.88 \pm 16.18	20.2 (13.2 - 31.4)	
Không	240 (61.5)	22.23 \pm 18.30	15.3 (9.7 - 28.5)	
Thời quen rượu bia				0.044
Không	200 (51.3)	21.13 \pm 17.18	15.5 (9.0 - 27.3)	
Có	190 (48.7)	24.70 \pm 17.72	20.0 (12.8 - 31.8)	

và kết quả DFI. DFI có liên quan đáng kể đến các đặc điểm của nam giới, chẳng hạn như thói quen uống rượu bia với $p < 0,05$. DFI không được tìm thấy có sự khác biệt đáng kể dựa trên tuổi tác, phân loại vô sinh, thời gian vô sinh, chỉ số khối cơ thể (BMI), nghề nghiệp, địa lý và thói quen hút thuốc lá.

Bảng 2 cho thấy giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn cho hai nhóm: DFI $\geq 30\%$ và DFI $< 30\%$. Đối với mỗi thông số tinh dịch được kiểm tra, không có sự khác biệt đáng kể giữa các giá trị thu được trong hai nhóm về pH, thể tích, nồng độ, vận động tiến triển, khả năng sống, hình thái bất thường và cổ đuôi bất thường. Bất thường ở đầu cao hơn ở nhóm DFI ≥ 30 so với nhóm DFI < 30 (tương ứng $86,90 \pm 5,50$ so với $85,33 \pm 4,90$). Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p = 0,009$.

Sự phụ thuộc của các biến tham số (tuổi nam giới, thể tích, mật độ, vận động, hình thái và sức sống tinh trùng) vào biến DFI được thể hiện trong Bảng 3. Không có mối tương quan giữa DFI và tuổi ($\rho = 0,098$, $p = 0,054$), DFI và thể tích tinh trùng ($\rho = 0,017$, $p = 0,736$), DFI và bất thường đuôi - cổ tinh trùng ($\rho = 0,029$, $p = 0,568$) và DFI và sức sống tinh trùng ($\rho = -0,016$, $p = 0,761$). Có một mối tương quan thuận có ý nghĩa giữa DFI và

hình thái bất thường ($\rho = 0,113$, $p = 0,027$), DFI và bất thường đầu ($\rho = 0,119$, $p = 0,002$) và tương quan nghịch có ý nghĩa giữa DFI và mật độ tinh trùng ($\rho = -0,160$, $p = 0,002$), DFI và di động tiến tới tinh trùng ($\rho = -0,155$, $p = 0,002$).

4. Bàn luận

Theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế thế giới WHO, phân tích tinh dịch bằng cách kiểm tra các thông số thông thường là phương pháp chính để đánh giá khả năng sinh sản của nam giới. Rõ ràng là phân tích tinh dịch có thể cung cấp một số thông tin về khả năng sinh sản của người đàn ông nhưng không phải lúc nào cũng có thể giải thích nguyên nhân gây vô sinh nam. Trên thực tế, nhiều trường hợp vô sinh nam là do bất thường DNA tinh trùng mà phân tích chất lượng tinh dịch thông thường không phát hiện được (2). Mối quan hệ giữa chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DFI) và các thông số tinh dịch vẫn chưa rõ ràng và vẫn còn gây tranh cãi. Trong khi một số nghiên cứu đã báo cáo về mối tương quan thuận giữa 2 xét nghiệm này (17), (36) thì các nghiên cứu khác không thể tìm thấy bất kỳ mối liên hệ nào giữa DFI và các thông số tinh trùng của con người (37), (22).

Vai trò của vật liệu di truyền DNA tinh trùng thông qua sự cuộn xoắn (nén chặt) và giải nén theo thời gian của cấu trúc protein của DNA tế bào. Quá trình nén chặt của protein giúp cấu trúc DNA nguyên vẹn không bị phân mảnh trong các giai đoạn phát triển phôi bào sau khi thụ tinh với trứng. Tinh trùng ở nhóm bệnh nhân vô sinh nam có mức độ tổn thương DNA cao (7). Các báo cáo nghiên cứu cho thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng (thông qua xét nghiệm SDC) với các đặc điểm tinh trùng sau: khả năng di chuyển của tinh trùng, hình thái và mật độ tinh trùng (17), (44).

Một nghiên cứu của Sivanarayana và cộng sự đã chỉ ra rằng tinh trùng có phân mảnh DNA tương quan nghịch với các thông số tinh dịch gồm: nồng độ, khả năng vận động và hình thái bình thường thấp hơn đáng kể ở nhóm DNA bất thường (DFI $\geq 30\%$) so với nhóm DNA bình thường (DFI $< 30\%$) (39). Một nghiên cứu khác của Muriel và cộng sự lại cho thấy mối tương quan nghịch giữa các tế bào

Bảng 2. Phân tích tinh dịch và chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DFI)

Tinh dịch đo	Tổng Mean \pm SD	DFI $\geq 30\%$	DFI $< 30\%$	Giá trị p
pH	7.11 \pm 0.26	7.06 \pm 0.19	7.11 \pm 0.27	0.130
Thể tích (ml)	1.67 \pm 0.91	1.62 \pm 0.92	1.69 \pm 0.91	0.493
Mật độ (mil/ml)	32.65 \pm 13.90	30.27 \pm 13.78	33.44 \pm 13.87	0.051
Di động tiến tới (%)	31.02 \pm 13.38	29.05 \pm 13.70	31.68 \pm 13.23	0.093
Sức sống tinh trùng (%)	78.55 \pm 9.90	77.86 \pm 11.86	78.78 \pm 9.16	0.427
Hình thái bất thường (%)	95.86 \pm 2.49	96.08 \pm 2.52	95.78 \pm 2.48	0.307
Bất thường đầu (%)	85.72 \pm 5.10	86.90 \pm 5.50	85.33 \pm 4.90	0.009
Bất thường đuôi - cổ (%)	61.74 \pm 10.53	62.81 \pm 10.75	61.39 \pm 10.45	0.251
DFI (%)	22.87 \pm 17.51	47.22 \pm 16.89	14.69 \pm 6.92	<0.001

Bảng 3. Mối liên quan giữa tuổi, các giá trị cơ bản của tinh dịch đo với chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng

Yếu tố	Chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng	
	Hệ số tương quan (ρ)	Giá trị P
Tuổi	0.098	0.054
Thể tích tinh trùng	0.017	0.736
Mật độ tinh trùng	-0.160	0.002
Bất thường hình thái tinh trùng	0.113	0.027
Di động tiến tới	-0.155	0.002
Sức sống tinh trùng	-0.016	0.761
Bất thường đầu tinh trùng	0.119	0.002
Bất thường đuôi - cổ	0.029	0.568

với chất nhuộm sắc bị thoái hóa và hình thái tinh trùng ($r = -0,29$, $p = 0,04$) (31). Hơn nữa, tỷ lệ tinh trùng có khả năng vận động tiến tới trong tinh dịch có tương quan nghịch với tỷ lệ tinh trùng có quầng sáng Halo nhỏ ($r = -0,22$, $p = 0,04$) và tương quan thuận với tỷ lệ tinh trùng có quầng sáng Halo lớn ($r = 0,30$, $p < 0,01$). Nhìn chung, sự phân mảnh DNA của tinh trùng có tương quan nghịch với khả năng vận động của tinh trùng (31).

Ngược lại, các nghiên cứu khác không tìm thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa các thông số tinh dịch thông thường và mức độ phân mảnh DNA của tinh trùng (37), (22). Ngay cả ở những người đàn ông mắc oligozoospermia, không có mối tương quan đáng kể giữa sự phân mảnh DNA của tinh trùng và sự vận động tiến bộ, sự tập trung hoặc hình thái học (8). DFI tương quan với chỉ một trong các tham số, chẳng hạn như hình thái (29), (20) hoặc sự di động tinh trùng (8). Kết quả của chúng tôi ở những người đàn ông từ các cặp vợ chồng vô sinh cho thấy không có mối tương quan giữa DFI và thể tích hoặc sức sống tinh trùng, nhưng lại cho thấy có sự tương quan thuận có ý nghĩa thống kê giữa DFI với bất thường hình thái tinh trùng, đặc biệt là bất thường đầu tinh trùng, đồng thời có sự tương quan nghịch giữa DFI và mật độ, sự di động tinh trùng.

Về hình thái tinh trùng, các bất thường ở đầu, đặc biệt là đầu vô định hình, được báo cáo có liên quan đến mức độ phân mảnh DNA cao (14). Tỷ lệ phần trăm của tinh trùng có hạt nhân bình thường có mối tương quan tiêu cực đáng kể với tỷ lệ phân mảnh DNA (33). Bằng cách đánh giá hình dạng đầu tinh trùng bằng phân tích Fourier hình elip và phát hiện sự phân mảnh DNA bằng xét nghiệm TUNEL, người ta đã kết luận rằng đầu tinh trùng có hình elip bất thường, góc cạnh và không bao hạt nhân lớn có liên quan đến sự phân mảnh DNA (43).

Trong nghiên cứu của chúng tôi, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về đầu bất thường giữa hai nhóm ($85,33 \pm 4,90$ so với $86,90 \pm 5,50$, $p = 0,009$) và mối tương quan dương giữa DFI và bất thường đầu tinh trùng ($r = 0,119$, $p = 0,002$). Đồng thời, có mối tương quan dương giữa DFI và bất thường hình thái tinh trùng ($r = 0,113$, $p = 0,027$). Tuy nhiên, chúng tôi không tìm thấy bất kỳ mối quan hệ nào giữa DFI và bất thường cổ -

đuôi tinh trùng ($p = 0,568$). Trong quá trình sinh tinh phát triển tinh trùng ở thể cực đầu, phần đầu của tinh trùng đang phát triển tạo nên bởi cấu trúc thể cực (acrosome) và sự cô đặc nhân (condensing nucleus), trong lúc đó sự phát triển của sợi trục kéo dài để trở thành đuôi, phần cổ (hay phần giữa) của tinh trùng dày lên là nơi chứa ty thể và là nơi các ATP năng lượng tạo ra cho sự chuyển động của tinh trùng (30). Vì vậy, bất kỳ tác động tiêu cực nào lên giai đoạn này sẽ dẫn đến hình thái bất thường của tinh trùng và xảy ra quá trình tổn thương DNA, tuy nhiên các ảnh hưởng có thể không gây tác động lên đuôi và cổ. Do đó phân tích chỉ số DFI có thể liên quan đến bất thường đầu nhưng không liên quan đến các bất thường ở cổ và đuôi.

Những thay đổi biến hiện gene và đột biến DNA cùng với các dị nguyên nhuộm sắc thể có liên quan đến việc tăng tuổi cha (38). Phân tích tinh dịch thông thường thường không thể phát hiện ra khiếm khuyết về sinh tinh (DFI cao) ở những người đàn ông lớn tuổi, do vậy, ở các cặp vợ chồng vô sinh có tuổi cha cao, kể cả khi các thông số tinh dịch bình thường, vẫn nên thực hiện xét nghiệm DNA tinh trùng như một phần của đánh giá cặp vợ chồng (15), (34). Tinh trùng có DFI cao hơn có ý nghĩa ở những người đàn ông lớn tuổi hơn (≥ 40 tuổi) so với những người đàn ông < 40 tuổi có phân tích tinh trùng bình thường, trong khi mật độ, độ di động tiến tới và hình thái tinh trùng không khác biệt đáng kể giữa hai nhóm này (15). Trong nghiên cứu hiện tại, chúng tôi không tìm thấy sự khác biệt đáng kể giữa sự phân mảnh DNA của tinh trùng dựa trên tuổi trong hai nhóm (≥ 35 tuổi so với < 35 tuổi). Đồng thời, trong phân tích đa biến, mối tương quan giữa DFI và tuổi cũng không có ý nghĩa thống kê ($r = 0,098$, $p = 0,054$). Trong các nghiên cứu trước đây, một mối tương quan dương nhẹ cũng được phát hiện giữa tuổi và tổn thương DNA (Komiya A, 2014), (28). Các báo cáo khác đã tìm thấy không có mối quan hệ giữa sự phân mảnh DNA và tuổi (32), (9).

Những căng thẳng và lối sống có thể ảnh hưởng đến đứt gãy DNA tinh trùng. Trong một nghiên cứu thực nghiệm trên chuột, sự xuất hiện của tổn thương DNA trong cùng các tế bào đã được ghi nhận bằng cách sử dụng xét nghiệm COMET, cho thấy sự gia tăng đáng kể về sự phá vỡ chuỗi đơn và chuỗi kép ở

chuiet phoi nhiem khoi thuooc la (25). Ket qua cua cac nghiien cuu nay cho thay khoi thuooc la anh huong xau den nhan tinh trugng, do do lam tang sự phân mảnh tinh trugng trong các mẫu tinh dịch. Trong các nghiien cuu lam sàng, mối quan hệ giữa hút thuốc và phân mảnh DNA tinh trugng đã được thảo luận trong các kết luận gây tranh cãi (37), (13). Trong nghiien cuu này, chúng tôi đã không tìm thấy một tác động đáng kể nào của việc hút thuốc lá đối với sự phân mảnh DNA của tinh trugng ($p = 0.364$).

Các nghiien cuu thực nghiien và lam sàng đã gợi ý rằng rượu bia làm tăng DFI bằng cách tăng hoạt động oxy phản ứng (6), (40). Trong một mô hình chuiet trưởng thành, tiêu thụ rượu làm gián đoạn khả năng vận động của tinh trugng, sự trưởng thành hạt nhân và tính toàn vẹn DNA của tinh trugng (40) (35). Các nghiien cuu ở người đã tiết lộ rằng tiêu thụ rượu gây ra những thay đổi đáng kể về hình thái trong tinh trugng, dẫn đến tinh trugng đầu và đuôi bất thường (26). Một nghiien cuu của

Akira Komiya cho thấy DFI khác biệt đáng kể dựa trên tình trạng rượu và sử dụng rượu mãn tính làm tăng DFI lên $49,6 \pm 23,3\%$ so với $33,9 \pm 18,0\%$ ở những người không thường xuyên uống rượu ($P = 0,0084$) (31). Kết quả của chúng tôi cho thấy rằng DFI ($24,70 \pm 17,72$) đã tăng trong các mẫu tinh dịch từ những người sử dụng rượu ($n = 190$) so với những người không thường xuyên sử dụng rượu ($21,13 \pm 17,18$) ($p = 0,044$).

5. Kết luận

Dữ liệu của chúng tôi cho thấy chỉ số phân mảnh DNA của tinh trugng không tương quan với tất cả các thông số tinh dịch thông thường mà chỉ tương quan với một độ, di động tiến tới, bất thường hình thái đặc biệt là bất thường đầu tinh trugng. Do đó, xét nghiien phân mảnh DNA tinh trugng nên được thực hiện như một bước bổ sung trong kiểm tra khả năng sinh sản của nam giới.

Tài liệu tham khảo

1. A.S.Rex, J.Aagaard and J.Fedder. (2017) DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology*. 2017 Jul; 5(4):622-630.
2. Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertility and sterility*. 2005;84(4):850-3.
3. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*. 2015;13:37.
4. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas Jr AJ, Alvarez JG, Sikka SC, Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility, *Fertil Steril* 2006;86:878–85.
5. Aitken RJ, De Iulius GN & McLachlan RI. (2009) Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 32, 46–56.
6. Akang EN, Oremosu AA, Osinubi AA, James AB, Biose IJ, Dike SI, et al. Alcohol-induced male infertility: Is sperm DNA fragmentation a causative? *Journal of Experimental and Clinical Anatomy*. 2017;16(1).
7. Avendano C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertility and sterility*. 2009;91(4):1077-84.
8. Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, Chahine H, Amar E, et al. Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2014;31(5):527-32.
9. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2011;28(5):425-32.
10. Brooker RJ. *Genetics: analysis and principles*. 4th ed. Ohio, USA: McGraw-Hill Higher Education; 2011.
11. Bungum M, Bungum L & Giwercman A. (2011) Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl* 13, 69–75.
12. Christensen P & Birck A. (2015) Comparison of methods for assesment of sperm DNA damage (fragmentation) and implications for the assisted reproductive technologies In: *Screening the Single Euploid Embryo* (ed. Scott Sills E, editor.), pp. 53–71. Springer International Publishing, Switzerland.
13. Cui X, Jing X, Wu X, Wang Z, Li Q. Potential effect of smoking on semen quality through DNA damage and the downregulation of Chk1 in sperm. *Mol Med Rep*. 2016;14(1):753-61.
14. Daris B, Goropevsek A, Hojnik N, Vlaisavljevic V. Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2010;281(2):363-7.
15. Das M, Al-Hathal N, San-Gabriel M, Phillips S, Kadoch IJ, Bissonnette F, et al. High prevalence of isolated sperm DNA damage in infertile men with advanced paternal age. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2013;30(6):843-8.
16. Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear

DNA integrity as related to fertility. *Animal reproduction science*. 2016;169:56-75.

17. Evgeni E, Lymberopoulos G, Touloupidis S, Asimakopoulos B. Sperm nuclear DNA fragmentation and its association with semen quality in Greek men. *Andrologia*. 2015;47(10):1166-74.

18. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez, Alvarez. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of andrology*. 2003;24(1):59-66.

19. Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin. *Archives of andrology*. 2000;45(3):215-25.

20. Hasanzadeh Keshteli S, Farsi MM, Khafri S. Should We Perform Semen Analysis, DNA Fragmentation, and Hypo-osmotic Swelling Tests together? *International journal of molecular and cellular medicine*. 2016;5(4):246-54.

21. Jarow J, Sigman M, Kolettis P. Optimal evaluation of the Infertile Male: Best Practice Statement reviewed and validity confirmed 2011. Available at: [http://www.auanet.org/guidelines/male-infertility-optimal-evaluation-\(reviewed-and-validity-confirmed-2011\)](http://www.auanet.org/guidelines/male-infertility-optimal-evaluation-(reviewed-and-validity-confirmed-2011)), 2016. Accessed September 2018.

22. Khalili MA, Aghaie-Maybodi F, Anvari M, Talebi AR. Sperm nuclear DNA in ejaculates of fertile and infertile men: correlation with semen parameters. *Urology journal*. 2006;3(3):154-9.

23. Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1991;6(7):987-91.

24. Komiya A, Kato T, Kawauchi Y, Watanabe A, Fuse H. Clinical factors associated with sperm DNA fragmentation in male patients with infertility. *TheScientificWorldJournal*. 2014;2014:868303.

25. La Maestra S, De Flora S, Micale RT. Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. *International journal of hygiene and environmental health*. 2015;218(1):117-22.

26. La Vignera S, Condorelli RA, Balercia G, Vicari E, Calogero AE. Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature. *Asian journal of andrology*. 2013;15(2):221-5.

27. Lopez G, Lafuente R, Checa MA, Carreras R, Brassesco M. Diagnostic value of sperm DNA fragmentation and sperm high-magnification for predicting outcome of assisted reproduction treatment. *Asian journal of andrology*. 2013;15(6):790-4.

28. Lu JC, Jing J, Chen L, Ge YF, Feng RX, Liang YJ, et al. Analysis of human sperm DNA fragmentation index (DFI) related factors: a report of 1010 subfertile men in China. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*. 2018;16(1):23.

29. Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, Saad A. Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Andrologia*. 2009;41(6):383-6.

30. Mescher AL. *The Male Reproductive System*. Junqueira's Basic Histology text and atlas: MC Graw Hill Education; 2016. p. 439 - 59.

31. Muriel L, Meseguer M, Fernandez JL, Alvarez J, Remohi J, Pellicer A, et al. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2006;21(3):738-44.

32. Nijs M, De Jonge C, Cox A, Janssen M, Bosmans E, Ombelet W. Correlation between male age, WHO sperm parameters, DNA fragmentation, chromatin packaging and outcome in assisted reproduction technology. *Andrologia*. 2011;43(3):174-9.

33. Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Silva LF, et al. Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage. *Fertility and sterility*. 2010;94(5):1937-40.

34. Petersen CG, Mauri AL, Vagnini LD, Renzi A, Petersen B, Mattila M, et al. The effects of male age on sperm DNA damage: an evaluation of 2,178 semen samples. *JBRA assisted reproduction*. 2018;22(4):323-30.

35. Rahimpour M, Talebi AR, Anvari M, Sarcheshmeh AA, Omid M. Effects of different doses of ethanol on sperm parameters, chromatin structure and apoptosis in adult mice. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2013;170(2):423-8.

36. Samplaski MK, Dimitromanolakis A, Lo KC, Grober ED, Mullen B, Garbens A, et al. The relationship between sperm viability and DNA fragmentation rates. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*. 2015;13:42.

37. Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliquet B, Bene MC, Monnier-Barbarino P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology*. 2006;223(1-2):54-60.

38. Sharma R, Agarwal A, Rohra VK, Assidi M, Abu-Elmagd M, Turki RF. Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*. 2015;13:35.

39. Sivanarayana T, Ravi Krishna C, Jaya Prakash G, Krishna KM, Madan K, Sudhakar G, et al. Sperm DNA fragmentation assay by sperm chromatin dispersion (SCD): correlation between DNA fragmentation and outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Reproductive medicine and biology*. 2014;13(2):87-94.

40. Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, Tabibnejad N. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 2011;45(4):403-9.

41. Tandara M, Bajic A, Tandara L, Bilic-Zulle L, Sunj M, Kozina V, et al. Sperm DNA integrity testing: big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. *Andrology*. 2014;2(5):678-86.

42. Tandara M, Bajic A, Tandara L, Sunj M, Jurišić Z, Jukić M. Correlation between proportions of sperm with DNA fragmentation assessed by Halosperm test and values of standard quality parameters of semen and possible impact on embryo quality. *Izvirni članek/Original article*. 2013;82:298 - 307.

43. Utsuno H, Oka K, Yamamoto A, Shiozawa T. Evaluation of sperm head shape at high magnification revealed correlation of sperm DNA fragmentation with aberrant head ellipticity and angularity. *Fertility and sterility*. 2013;99(6):1573-80.

44. Velez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jimenez C, Wittemer C, et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertility and sterility*. 2008;90(5):1792-9.

45. Venkatesh S, Singh A, Shamsi MB, Thilagavathi J, Kumar R, Mitra DK, et al. Clinical significance of sperm DNA damage threshold value in the assessment of male infertility. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)*. 2011;18(10):1005-13.

46. Wiweco B, Utami P. Predictive value of sperm deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation index in male infertility. *Basic and clinical andrology*. 2017;27:1.

47. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*. Switzerland. 2010.