

# Nghiên cứu mối liên quan giữa sự phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả thụ tinh trong ống nghiệm cổ điển

Trần Gia Cát Tường<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Thái Thanh<sup>1</sup>, Lê Minh Tâm<sup>2</sup>

(1) Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế

(2) Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

## Tóm tắt

**Đặt vấn đề:** Chỉ số phân mảnh DNA (DFI) tinh trùng được xem là một trong những thước đo để đánh giá khả năng sinh sản của nam giới, tuy nhiên ảnh hưởng của DFI đến kết quả thụ tinh ống nghiệm cổ điển vẫn còn nhiều tranh luận. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu tìm hiểu mối liên quan giữa sự phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả thụ tinh ống nghiệm cổ điển. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 64 cặp vợ chồng hiếm muộn điều trị IVF cổ điển tại Trung tâm Nội tiết Sinh sản và Vô sinh, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế. Sự phân mảnh DNA tinh trùng được xác định bằng xét nghiệm phân tán chất nhuộm sắc. Kiểm tra thụ tinh sau 16 - 18 giờ noãn được cấy IVF cổ điển. Phôi được đánh giá theo sự đồng thuận của Istanbul (2011) vào ngày 2 và ngày 5. **Kết quả:** Nhóm DFI  $\leq 15\%$  có tỷ lệ thụ tinh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm DFI  $> 15\%$  (76,41% với 68,73%,  $p=0,037$ ). Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm về đặc điểm phôi ngày 2, ngày 5. Mức độ phân mảnh DNA tinh trùng có mối tương quan nghịch với tỷ lệ thụ tinh sau IVF cổ điển ( $r=-0,270$ ;  $p=0,031$ ). **Kết luận:** Sự phân mảnh DNA tinh trùng có mối tương quan nghịch với tỷ lệ thụ tinh sau IVF cổ điển.

**Từ khóa:** DFI, phân mảnh DNA tinh trùng, phân tán chất nhuộm sắc, kết quả IVF cổ điển.

## The correlation between the sperm DNA fragmentation and the outcome of conventional in vitro fertilisation (IVF)

Tran Gia Cat Tuong<sup>1\*</sup>, Nguyen Thi Thai Thanh<sup>1</sup>, Le Minh Tam<sup>2</sup>

(1) Hue Center for Reproductive Endocrinology and Infertility, Hue University Hospital

(2) Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

## Abstract

**Background:** Sperm DNA fragmentation index (DFI) is considered one of the measures to assess male fertility, but the impact of DFI on the results of conventional *in vitro* fertilization is still controversial. This study aimed to evaluate the correlation between the sperm DNA fragmentation and the outcome of conventional IVF. **Materials and method:** The cross-sectional study was performed on 64 infertile couples by IVF method at Hue Center for Reproductive Endocrinology and Infertility, Hue University Hospital. Sperm DNA fragmentation was determined by the chromatin dispersion assay, and the level of fragmentation was calculated via DFI. After 16-18 hours of IVF implantation, the fertilized oocytes were assessed. Evaluate embryos on days 2 and 5 according to the Istanbul Consensus (2011). **Results:** The DFI  $\leq 15\%$  group showed a statistically significantly higher fertilization rate than the DFI  $> 15\%$  group (76.41% vs. 68.73%,  $p=0.037$ ). There were no statistically significant differences between the two groups in embryo characteristics on days 2 and 5. The level of sperm DNA fragmentation was negatively correlated with the fertilization rate after conventional IVF ( $r=-0.270$ ;  $p=0.031$ ). **Conclusion:** There was a negative correlation between sperm DNA fragmentation and post-IVF fertilization rate.

**Keywords:** DFI, DNA fragmentation, sperm chromatin dispersion, IVF outcomes.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ VÀ MỤC TIÊU

Thụ tinh trong ống nghiệm (*in vitro* fertilization - IVF) cổ điển là kỹ thuật đồng nuôi cấy noãn có lớp cumulus bên ngoài cùng với một lượng tinh trùng di động trong một khoảng thời gian. Sự thành công

của IVF cổ điển liên quan nhiều đến đặc điểm của noãn và tinh trùng. Cụ thể, sự trưởng thành noãn liên quan đến việc tiếp tục giảm phân và hoàn thành các hoạt động tế bào chất. Sự trưởng thành của tinh trùng liên quan đến những thay đổi sinh lý xảy

Tác giả liên hệ: Trần Gia Cát Tường. Email: tgctuong@hueuni.edu.vn

Ngày nhận bài: 4/10/2024; Ngày đồng ý đăng: 24/11/2024; Ngày xuất bản: 25/12/2024

DOI: 10.34071/jmp.2024.7.15

ra trong quá trình di chuyển từ tinh hoàn đến mào tinh trước khi phóng tinh, năng lực thụ tinh khi tinh trùng tiếp cận và liên kết với màng zona pellucida của noãn [1].

Theo Tổ chức Y tế Thế giới, hiện nay có khoảng 17,5% các cặp vợ chồng gặp vấn đề về khả năng sinh sản, trong đó khoảng 40% trường hợp vô sinh do nam giới [2]. Việc đánh giá khả năng sinh sản của nam giới chủ yếu dựa vào kết quả tinh dịch đồ. Tuy nhiên, kết quả này vẫn còn nhiều hạn chế khi trên thực tế có khoảng 15% nam giới vô sinh nhưng có các thông số tinh dịch đồ bình thường. Điều này cho thấy phân tích tinh dịch đồ thường quy mặc dù cung cấp nhiều thông tin cơ bản nhưng không thể hiện được tình trạng nội tại của tinh trùng.

Tinh trùng mang một nửa bộ nhiễm sắc thể của người nam, cùng kết hợp với noãn trong quá trình thụ tinh để tạo thành phôi, do đó việc đảm bảo tính toàn vẹn của DNA tinh trùng là vô cùng quan trọng. Nam giới vô sinh có mức độ phân mảnh DNA tinh trùng cao hơn so với nhóm có khả năng sinh sản bình thường. Đồng thời trong số những nam giới vô sinh không rõ nguyên nhân, tỷ lệ phân mảnh DNA tăng cao được tìm thấy ở 20% trường hợp [3]. Do đó hiện nay, nhiều trung tâm hỗ trợ sinh sản đã thực hiện xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng cùng với quy trình phân tích tinh dịch thông thường để nâng cao độ chính xác trong đánh giá khả năng sinh sản ở nam giới.

Chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DFI) phản ánh tính toàn vẹn và mức độ tổn hại của DNA - vật liệu di truyền của tinh trùng, từ đó phát hiện khả năng tổn thương tinh trùng. Nhiều nghiên cứu cho thấy sự phân mảnh DNA tinh trùng ảnh hưởng đến tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ tạo phôi ngày 3, tỷ lệ tạo phôi nang,... Chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng cao có liên quan đến tỷ lệ thai lâm sàng thấp hơn trong chu kỳ thụ tinh ống nghiệm cổ điển (IVF) và tỷ lệ sảy thai cao hơn trong các chu kỳ tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI). Tuy nhiên một số nghiên cứu khác lại báo cáo rằng không tìm thấy mối liên quan giữa sự phân mảnh DNA tinh trùng với khả năng thụ tinh, tỷ lệ tạo phôi, tỷ lệ thai lâm sàng và tỷ lệ sảy thai [4]. Có thể thấy ảnh hưởng của chỉ số phân mảnh DNA (DNA fragmentation index - DFI) tinh trùng đến khả năng thụ tinh và sự phát triển của phôi vẫn còn chưa rõ ràng. Đồng thời vẫn còn khá ít các nghiên cứu chuyên sâu thực hiện trên các mẫu bệnh nhân điều trị IVF cổ điển để đánh giá mối tương quan giữa sự phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả IVF. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu: So sánh kết quả sau IVF cổ điển

giữa các nhóm bệnh nhân có độ phân mảnh DNA tinh trùng khác nhau và đánh giá mối liên quan giữa độ phân mảnh DNA tinh trùng với kết quả phôi sau IVF cổ điển.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang được thực hiện trên 64 cặp vợ chồng điều trị vô sinh bằng phương pháp IVF cổ điển tại Trung tâm Nội tiết sinh sản và Vô sinh Huế (HueCREI), Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế trong khoảng thời gian từ tháng 03 năm 2022 đến tháng 03 năm 2023. Tiêu chuẩn chọn mẫu nghiên cứu gồm các cặp vợ chồng có đầy đủ thông tin hành chính, lâm sàng, cận lâm sàng và các xét nghiệm liên quan. Người vợ có từ 8 noãn trưởng thành trở lên để thực hiện kỹ thuật IVF cổ điển. Tiêu chuẩn loại trừ gồm các cặp vợ chồng mắc bệnh truyền nhiễm hoặc đã từng làm IVF thất bại hoặc các chu kỳ trước đó không có phôi; người vợ có u buồng trứng, lạc nội mạc tử cung; người chồng giãn tĩnh mạch thừng tinh, xuất tinh ngược dòng, các mẫu tinh trùng yếu, ít, dị dạng hoặc không có tinh trùng, tinh trùng được bảo quản lạnh hoặc thu nhận từ mẫu phẫu thuật. Các chu kỳ IVF có xin tinh trùng hiến tặng hoặc xin noãn hiến tặng đều bị loại khỏi nghiên cứu.

### 2.2. Xét nghiệm tinh dịch đồ

Quy trình và tiêu chuẩn đánh giá tinh dịch đồ được tiến hành theo hướng dẫn của WHO 2010 dưới sự thực hiện của hai chuyên viên phôi học có kinh nghiệm. Sau khi ly giải ở 37°C, mẫu tinh dịch sẽ được đánh giá đại thể gồm các thông số: thể tích mẫu, độ nhớt, màu sắc, độ Ph; và đánh giá vi thể gồm: đánh giá sự kết dính, kết đám, khả năng di động, sức sống, mật độ và hình thái của tinh trùng, cũng như sự hiện diện của các sợi nhầy và tế bào tròn (tế bào mầm và bạch cầu).

### 2.3. Xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng

Sự phân mảnh DNA tinh trùng được đánh giá bằng xét nghiệm phân tán chất nhiễm sắc tinh trùng (Sperm chromatin dispersion - SCD). Đây là kỹ thuật dựa trên quãng halo được hình thành khi protein nhân bị loại bỏ sau khi biến tính bởi acid. Bộ kit xét nghiệm Halosperm® (Halo DNA SL, Tây Ban Nha) được sử dụng để phân tích tỷ lệ phân mảnh DNA tinh trùng. Mẫu tinh dịch sẽ được pha loãng với đệm PBS để thu được tối đa  $20 \times 10^6$  tinh trùng/mL trước khi trộn với agarose nhằm cung cấp một chất nền huyền phù trợ để thao tác với tế bào. Mẫu được nạp vào giếng mẫu và giữ ở 4°C trong 5 phút. Sau đó, mẫu được ủ với dung dịch acid trong 7 phút để tháo xoắn DNA và với dung dịch ly giải trong 25 phút để loại bỏ protein hạt

nhân. Lam kính được rửa bằng nước cất trong 5 phút và khử nước bằng ethanol 70%, ethanol 100% trong 2 phút mỗi lần. Sau khi để khô trong không khí, tiêu bản được nhuộm màu và đánh giá dưới kính hiển vi ở độ phóng đại x100 bởi hai chuyên viên phôi học có kinh nghiệm. Tinh trùng có DNA không phân mảnh sẽ phân tán DNA vòng và hình thành quầng halo kích thước lớn, trong khi tinh trùng có DNA phân mảnh sẽ cho quầng halo nhỏ, không tạo thành quầng halo hoặc tinh trùng thoái hóa.

Cách đánh giá quầng halo:

- Tinh trùng có quầng lớn: là những tinh trùng có chiều rộng quầng bằng hoặc lớn hơn đường kính của nhân.

- Tinh trùng có quầng cỡ trung bình: kích thước quầng của chúng nằm giữa loại có quầng lớn và loại có quầng nhỏ (chiều rộng quầng từ 1/3 đến 1 lần đường kính nhân).

- Tinh trùng có quầng nhỏ: chiều rộng quầng bằng hoặc nhỏ hơn 1/3 đường kính của nhân.

- Tinh trùng không có quầng: tinh trùng không có quầng, nhân không đều màu và vẫn bắt màu thuốc nhuộm.

- Tinh trùng thoái hóa: những tinh trùng không có quầng và nhân không đều hoặc bắt màu thuốc nhuộm ít.

Cách tính chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DFI)

$$DFI = \frac{\text{Tinh trùng quầng nhỏ} + \text{Tinh trùng không quầng} + \text{Tinh trùng thoái hóa}}{(500 \text{ tinh trùng đếm được})} \times 100$$

#### 2.4. Kích thích buồng trứng và chọc hút noãn

Trong nghiên cứu này, số lượng nang trứng được xác định thông qua siêu âm âm đạo vào ngày thứ 2 - 3 của chu kỳ kinh nguyệt. Người vợ được kích thích buồng trứng bằng phác đồ đối vận GnRH với liều khởi đầu của hormone rFSH là 225 - 250 IU mỗi ngày trong 8-10 ngày. Liều FSH dựa trên dự đoán đáp ứng buồng trứng: đáp ứng bình thường, đáp ứng kém hay đáp ứng cao. Các chỉ báo đáp ứng buồng trứng chủ yếu dựa vào tuổi đời, chỉ số nang thứ cấp (AFC) và AMH, cùng với một số yếu tố tham khảo như BMI, tiền sử đáp ứng buồng trứng trước đây, FSH và estradiol cơ bản. Thuốc đối vận GnRH liều 0,25 mg/ngày được bổ sung vào ngày thứ 7 của chu kỳ hoặc khi có ít nhất 1 nang đạt kích thước 14 mm. Bệnh nhân sẽ được tiêm hCG để kích hoạt sự trưởng thành noãn khi có ít nhất 2 nang noãn có kích thước từ 18 mm trở lên. Chọc hút noãn được thực hiện trong 35 - 36 giờ sau đó theo hướng dẫn của siêu âm qua ngã âm đạo.

#### 2.5. Chuẩn bị tinh trùng cho thụ tinh trong ống nghiệm cổ điển

Mẫu tinh trùng được chuẩn bị cho IVF cổ điển

bằng phương pháp ly tâm theo nồng độ không liên tục. Đặt lớp môi trường trong ống nghiệm đáy nhọn 15 ml với 1,5 ml Sil-select plus upper (FertiPro®, Bỉ) (45%) ở trên và 1,5 ml Sil-select plus lower (FertiPro®, Bỉ) (90%) ở dưới. Tinh dịch được chia làm 2 phần bằng nhau, mỗi phần được đặt vào ống nghiệm đáy nhọn 15 ml chứa môi trường thang nồng độ đã chuẩn bị từ trước. Ly tâm 350g trong 15 phút. Thu cặn tinh trùng và tiếp tục rửa mẫu với lần lượt 3 ml Fertilcult Flushing (FertiPro, Bỉ) và 3 ml SpermRinse (Vitrolife, Thụy Điển). Ly tâm 350g mỗi lần rửa trong 10 phút. Sau rửa, loại bỏ phần dịch nổi và thu 0,3 ml môi trường tinh trùng. Dựa vào mật độ và tỷ lệ tinh trùng tiến tới/ml, tính toán thể tích để cuối cùng đạt mật độ là 200.000 tinh trùng/ml di động tiến tới.

#### 2.6. Cấy IVF cổ điển và nuôi cấy phôi

Sau khi thu nhận, các phức hợp tế bào noãn - tế bào hạt - tế bào vành tia (Cumulus - corona - Oocyte Complex - COC) được thu hồi và rửa trong G-MOPS PLUS (Vitrolife, Thụy Điển) trước khi được nuôi cấy trong G-IVF PLUS (Vitrolife, Thụy Điển) trong 2 giờ ở 37°C tại tủ ấm có 6% CO<sub>2</sub> và 5% O<sub>2</sub>. Sau đó, tinh trùng được nạp vào các khối COC với nồng độ 200.000 tinh trùng/ml rồi tiến hành đồng nuôi cấy COC và tinh trùng trong 4 giờ ở tủ nuôi cấy 6% CO<sub>2</sub> và 5% O<sub>2</sub>. Noãn sau đó sẽ được tách khỏi COC bằng pipette tách trong môi trường G-MOPS PLUS (Vitrolife, Thụy Điển). Noãn sau tách được kiểm tra trên kính hiển vi đảo ngược để đánh giá hình thái cũng như ghi nhận sự tổng xuất thể cực thứ hai (nếu có) và tiếp tục nuôi cấy trong giọt G-TL (Vitrolife, Thụy Điển) được phủ dầu và đặt trong tủ benchtop với 6% CO<sub>2</sub> và 5% O<sub>2</sub> ở 37°C.

Quá trình đánh giá tuân theo hệ thống tính điểm Gardner và sự đồng thuận của Istanbul [5]. Đánh giá thụ tinh được tiến hành vào 16 - 18 giờ kể từ thời điểm bắt đầu đồng nuôi cấy. Sự thụ tinh bình thường được xác nhận thông qua sự hiện diện của hai tiền nhân. Giai đoạn phôi phân cắt được đánh giá vào ngày 2 tại thời điểm 40 - 44 giờ sau khi thụ tinh và quá trình đánh giá phôi nang diễn ra vào thời điểm 112 - 124 giờ sau khi thụ tinh. Phôi nang được xác định dựa trên sự hình thành khoang phôi và quá trình biệt hóa giữa khối tế bào bên trong và tế bào lá nuôi phôi. Dựa trên việc đánh giá từng tiêu chí, một phôi nang chất lượng tốt được xác định là có khoang phôi nang chứa đầy chất lỏng, khối tế bào bên trong được nén chặt và một lớp tế bào lá nuôi phôi gắn kết. Việc đánh giá bao gồm quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi đảo ngược ở độ phóng đại x200 bởi hai chuyên viên phôi học có kinh nghiệm.

#### 2.7. Thu thập số liệu và phân tích thống kê

Sau khi lựa chọn mẫu và thu thập thông tin chung

cũng như kết quả IVF, chúng tôi tiến hành tìm hiểu ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự phân mảnh DNA tinh trùng, bao gồm: độ tuổi, loại vô sinh, chỉ số BMI ( $\text{kg/m}^2$ ) (bằng cân nặng/bình phương chiều cao). Kết quả điều trị IVF bao gồm các thông số: tỷ lệ thụ tinh bình thường (%) (bằng số hợp tử thụ tinh bình thường/ số noãn trưởng thành); tỷ lệ phôi < 4 tế bào (%) (bằng số phôi < 4 tế bào/tổng số phôi ngày 2), tỷ lệ phôi  $\geq 4$  tế bào (%) (bằng số phôi  $\geq 4$  tế bào/tổng số phôi ngày 2), tỷ lệ phôi có mảnh vỡ < 10% (%) (bằng số phôi có mảnh vỡ < 10%/tổng số phôi ngày 2), tỷ lệ phôi có mảnh vỡ từ 10 - 20% (%) (bằng số phôi có mảnh vỡ từ 10 - 20%/tổng số phôi ngày 2), tỷ lệ phôi có mảnh vỡ > 20% (%) (bằng số phôi có mảnh vỡ > 20%/tổng số phôi ngày 2); tỷ lệ phôi nang hữu dụng (%) (bằng số phôi nang hữu dụng/tổng số phôi ngày 5) và tỷ lệ phôi nang tốt (%) (bằng số phôi nang tốt/tổng số phôi ngày 5).

Tất cả các phân tích được thực hiện bằng phần mềm SPSS, phiên bản 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Phân phối chuẩn được kiểm tra bằng kiểm định Kolmogorov-Smirnow test. Dữ liệu số được

trình bày dưới trung vị, khoảng tứ vị hoặc dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn. Tần số được thể hiện bằng tỷ lệ phần trăm. Giá trị trung bình, tỷ lệ phần trăm được so sánh giữa các nhóm bằng cách sử dụng kiểm định T-test và Chi-square. Sử dụng Mann-Whitney U test để kiểm tra mối liên quan giữa các biến có phân bố không chuẩn. Hồi quy tuyến tính đa biến được dùng để khử các yếu tố gây nhiễu. Hệ số tương quan của Spearman (r) thể hiện mối tương quan giữa chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả thụ tinh. Giá trị  $p < 0,05$  được coi là có ý nghĩa thống kê.

### 3. KẾT QUẢ

Từ tháng 3 năm 2022 đến tháng 03 năm 2023, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ở 64 trường hợp điều trị thụ tinh ống nghiệm cổ điển đáp ứng đầy đủ các yếu tố liên quan đến nghiên cứu. Dựa vào chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DFI), 64 cặp vợ chồng được chia thành 2 nhóm gồm nhóm có  $\text{DFI} \leq 15\%$  (nhóm không đứt gãy DNA tinh trùng) và nhóm có  $\text{DFI} > 15\%$  (nhóm có đứt gãy DNA tinh trùng).

**Bảng 1.** Đặc điểm chung theo chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng

| Đặc điểm chung                |             | Tổng<br>(N=64)          | DFI $\leq 15\%$<br>(N=33) | DFI $> 15\%$<br>(N=31)  | Giá trị<br>p |
|-------------------------------|-------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------|
| Tuổi vợ (năm)                 |             | 32,00<br>(30,00; 33,00) | 31,00<br>(29,50; 33,00)   | 32,00<br>(30,00; 34,00) | 0,185        |
| < 35                          |             | 53 (82,8%)              | 29 (54,7%)                | 24 (45,3%)              | 0,268        |
| $\geq 35$                     |             | 11 (17,2%)              | 4 (36,4%)                 | 7 (63,6%)               |              |
| Tuổi chồng (năm)              |             | 34,00<br>(32,00; 38,00) | 34,00<br>(32,00; 38,00)   | 34,00<br>(32,00; 38,00) | 0,824        |
| < 35                          |             | 35 (54,7%)              | 18 (51,4%)                | 17 (48,6%)              | 0,981        |
| $\geq 35$                     |             | 29 (45,3%)              | 15 (51,7%)                | 14 (48,3%)              |              |
| BMI vợ ( $\text{kg/m}^2$ )    |             | 20,30<br>(19,10; 21,20) | 19,90<br>(19,10; 21,10)   | 20,40<br>(19,10; 22,30) | 0,139        |
| BMI chồng ( $\text{kg/m}^2$ ) |             | 23,90<br>(21,70; 25,68) | 22,50<br>(21,40; 25,45)   | 24,50<br>(22,00; 26,90) | 0,045        |
| Loại vô sinh                  | Nguyên phát | 35 (54,7%)              | 19 (54,3%)                | 16 (45,7%)              | 0,632        |
|                               | Thứ phát    | 29 (45,3%)              | 14 (48,3%)                | 15 (51,7%)              |              |

*Các biến liên tục được biểu diễn dưới dạng trung vị, khoảng tứ vị; các biến tỷ lệ được thể hiện bằng %.*

Bảng 1 mô tả thông tin chung của các cặp vợ chồng tham gia nghiên cứu. Tuổi của người vợ nằm trong độ tuổi sinh sản, trong đó phụ nữ trên 35 tuổi chiếm 17,2%. Độ tuổi của người chồng là 34 (32; 38) và có 45,3% trường hợp trên 35 tuổi. Độ tuổi của các cặp vợ chồng giữa 2 nhóm phân mảnh

DNA không có khác biệt có ý nghĩa thống kê. Điều này cũng tương tự đối với chỉ số khối cơ thể (BMI) của người vợ. Ngược lại chỉ số khối cơ thể (BMI) của người chồng trong các cặp vợ chồng nghiên cứu ở nhóm có  $\text{DFI} \leq 15\%$  lại thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm  $\text{DFI} > 15\%$  (22,50 (21,40; 25,45)  $\text{kg/m}^2$  so với 24,50 (22,00; 26,90)  $\text{kg/m}^2$ ,  $p=0,045$ ). Trong 64 trường hợp nghiên cứu, nhóm vô sinh nguyên phát chiếm tỷ lệ cao hơn (54,7%).

**Bảng 2.** Đặc điểm thông số tinh dịch đồ và mối liên quan với mức độ tổn thương DNA tinh trùng

| Các thông số                          | Tổng<br>(N=64)          | DFI ≤ 15%<br>(N=33)     | DFI > 15%<br>(N=31)     | Giá trị<br>p |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------|
| Thể tích (ml)                         | 2,50<br>(1,70; 3,72)    | 2,00<br>(1,50; 3,40)    | 2,70<br>(2,70; 4,00)    | 0,180        |
| pH                                    | 7,78<br>(7,53; 8,00)    | 7,84<br>(7,51; 8,03)    | 7,75<br>(7,56; 7,98)    | 0,389        |
| Mật độ (10 <sup>6</sup> /ml)          | 35,00<br>(26,00; 49,50) | 42,00<br>(27,00; 50,50) | 30,00<br>(25,00; 45,00) | 0,291        |
| Tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới (%) | 25,73 ± 9,87            | 28,15 ± 9,60            | 23,16 ± 9,64            | 0,042        |
| Tỷ lệ tinh trùng sống (%)             | 86,00<br>(82,00; 88,00) | 87,00<br>(83,00; 89,00) | 85,00<br>(81,00; 88,00) | 0,094        |
| Hình thái bình thường (%)             | 3,00<br>(2,00; 3,00)    | 3,00<br>(2,00; 4,00)    | 2,00<br>(2,00; 3,00)    | 0,239        |
| Bất thường đầu (%)                    | 95,50<br>(94,00; 97,00) | 95,00<br>(92,50; 97,00) | 97,00<br>(95,00; 97,00) | 0,179        |
| Bất thường cổ-đuôi (%)                | 47,00<br>(44,25; 49,00) | 46,00<br>(42,00; 49,00) | 47,00<br>(45,00; 51,00) | 0,043        |

Các biến liên tục được biểu diễn dưới dạng trung vị, khoảng tứ vị hoặc bằng số trung bình và độ lệch chuẩn (trung bình ± SD).

Bảng 2 cho thấy các thông số mật độ tinh trùng, tỷ lệ tinh trùng sống hay hình thái tinh trùng bình thường của nhóm DFI ≤ 15% có xu hướng tốt hơn nhóm DFI > 15%, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Trong khi đó, nhóm không phân mảnh DNA lại có tỷ lệ tinh trùng di động tiến

tới cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm phân mảnh DNA tinh trùng ( $28,15 \pm 9,60\%$  so với  $23,16 \pm 9,64\%$ ,  $p = 0,042$ ). Ngoài ra, tỷ lệ bất thường cổ-đuôi tinh trùng ở nhóm không phân mảnh thấp hơn so với nhóm có phân mảnh DNA tinh trùng ( $46,00$  ( $42,00$ ;  $49,00$ )% so với  $47,00$  ( $45,00$ ;  $51,00$ )%,  $p = 0,043$ ).

**Bảng 3.** Mối liên quan giữa kết quả thụ tinh, kết quả phôi thụ tinh ống nghiệm cổ điển và mức độ phân mảnh DNA tinh trùng

| Đặc điểm                              | Tổng<br>(N=64)        | DFI ≤ 15%<br>(N=33)   | DFI > 15%<br>(N=31)    | Giá trị p |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------|
| Số noãn trưởng thành trung bình       | 9,00<br>(6,00; 12,00) | 8,00<br>(6,00; 11,00) | 10,00<br>(8,00; 13,00) | 0,054     |
| Số hợp tử thụ tinh trung bình         | 6,00<br>(4,24; 8,75)  | 6,00<br>(5,00; 8,00)  | 6,00<br>(4,00; 10,00)  | 0,807     |
| Tỷ lệ thụ tinh bình thường (%)        | 72,32%<br>(439/607)   | 76,41%<br>(217/284)   | 68,73%<br>(222/323)    | 0,037     |
| Số phôi ngày 2 trung bình             | 6,00<br>(4,25; 8,00)  | 6,00<br>(5,00; 7,50)  | 6,00<br>(4,00; 10,00)  | 0,714     |
| Tỷ lệ phôi < 4 TB (%)                 | 17,99%<br>(77/428)    | 16,75%<br>(35/209)    | 19,18%<br>(42/219)     | 0,512     |
| Tỷ lệ phôi ≥ 4 TB (%)                 | 82,01%<br>(351/428)   | 83,25%<br>(174/209)   | 80,82%<br>(177/219)    | 0,513     |
| Tỷ lệ phôi có mảnh vỡ < 10% (%)       | 79,21%<br>(339/428)   | 80,86%<br>(169/209)   | 77,63%<br>(170/219)    | 0,411     |
| Tỷ lệ phôi có mảnh vỡ từ 10 - 20% (%) | 17,52%<br>(75/428)    | 16,27%<br>(34/209)    | 18,72%<br>(41/219)     | 0,504     |

|                                 |                      |                      |                       |       |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-------|
| Tỷ lệ phôi có mảnh vỡ > 20% (%) | 3,27%<br>(14/428)    | 2,87%<br>(6/209)     | 3,65%<br>(8/219)      | 0,649 |
| Số phôi ngày 5 trung bình       | 6,00<br>(4,25; 8,00) | 6,00<br>(5,00; 7,50) | 6,00<br>(4,00; 10,00) | 0,714 |
| Tỷ lệ phôi nang hữu dụng (%)    | 68,69%<br>(294/428)  | 71,29%<br>(149/209)  | 66,21%<br>(145/219)   | 0,259 |
| Tỷ lệ phôi nang tốt (%)         | 45,79%<br>(196/428)  | 47,37%<br>(99/209)   | 44,29%<br>(97/219)    | 0,638 |

Các biến liên tục được biểu diễn dưới dạng trung vị, khoảng tứ phân vị; các biến tỷ lệ được thể hiện bằng %.

Số noãn trưởng thành và số noãn thụ tinh thu được lần lượt là 9,00 (6,00; 12,00) và 6,00 (4,24; 8,75), hai thông số này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm phân mảnh DNA tinh trùng ( $p>0,05$ ). Tỷ lệ thụ tinh bình thường của mẫu nghiên cứu là 72,32%, trong đó nhóm DFI  $\leq 15\%$  có tỷ lệ thụ tinh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm DFI  $> 15\%$  (76,41% so với 68,73%,  $p=0,037$ ). Đối với

tổng số phôi ngày 2 cũng như các đặc điểm phôi giai đoạn phân chia ngày 2, giữa hai nhóm nghiên cứu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ). Điều này cũng tương tự với số phôi ngày 5, tỷ lệ tạo phôi nang hữu dụng và tỷ lệ phôi nang tốt mặc dù hai tỷ lệ này có xu hướng cao hơn ở nhóm không phân mảnh DNA tinh trùng.

**Bảng 4.** Mối tương quan giữa sự phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả thụ tinh ống nghiệm cổ điển

| Các yếu tố                       | Chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng |           |
|----------------------------------|---------------------------------|-----------|
|                                  | Hệ số tương quan (r)            | Giá trị p |
| Tỷ lệ thụ tinh bình thường (%)   | -0,270                          | 0,031     |
| Tỷ lệ tạo phôi nang hữu dụng (%) | -0,094                          | 0,458     |
| Tỷ lệ tạo nang tốt (%)           | -0,081                          | 0,525     |

Bảng 4 cho thấy mức độ phân mảnh DNA tinh trùng có mối tương quan nghịch yếu với tỷ lệ thụ tinh sau IVF cổ điển ( $r=-0,27$ ;  $p=0,031$ ). Tỷ lệ phôi nang hữu dụng và tỷ lệ phôi nang tốt tuy có mối tương quan nghịch với sự phân mảnh DNA tinh trùng nhưng mối tương quan này không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ).

#### 4. BÀN LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi có phân tích một số yếu tố liên quan của người chồng bao gồm độ tuổi, BMI với sự phân mảnh DNA tinh trùng. Tuổi có liên quan đến sự tích lũy ROS, dẫn đến kích hoạt quá trình peroxy hoá lipid và hình thành các loại phản ứng oxy hoá trong ty thể. Ngoài ra, lão hoá còn liên quan đến cả tổn thương DNA nhân và ty thể, cũng như làm giảm khả năng vận động của tinh trùng, tăng khả năng đóng gói sai chất nhiễm sắc của tinh trùng và rối loạn apoptosis. Điều này chứng tỏ độ tuổi của nam giới là một trong những yếu tố có thể dẫn đến sự phân mảnh DNA tinh trùng. Nghiên cứu của Petersen và cộng sự (2018) cho thấy nam giới  $\geq 45$  tuổi có mức độ phân mảnh DNA cao nhất trong ba nhóm tuổi nghiên cứu gồm  $< 35$ ,  $36 - 44$  và  $\geq 45$  [6]. Một số nghiên cứu khác cũng chứng minh nam

giới trên 50 tuổi có khả năng bị phân mảnh DNA tinh trùng cao hơn 4,58 lần so với nam giới trong độ tuổi 21 - 30 [7]. Tuy nhiên trong nghiên cứu hiện tại, chúng tôi ghi nhận không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về DFI giữa 2 nhóm tuổi người chồng  $< 35$  và  $\geq 35$ , tương tự với một số nghiên cứu trước đó [6]. Người chồng trong nghiên cứu của chúng tôi phần lớn đều trẻ tuổi và trong độ tuổi sinh sản nên chưa phân tích được sự ảnh hưởng của tuổi đến chất lượng tinh trùng.

Chỉ số khối cơ thể (BMI) có thể là một chỉ số độc lập ảnh hưởng đến sự phân mảnh DNA tinh trùng [8]. Theo một số nghiên cứu, các kho dự trữ ở mô mỡ có thể tăng cường mức oxy hoá khử thông qua quá trình oxy hóa acid béo ty thể và peroxisome dẫn đến tình trạng viêm nhiễm, từ đó ảnh hưởng đến khả năng sinh sản và chức năng tinh trùng [9]. Trên thực tế, nồng độ testosterone cao ở nam giới béo phì có thể tăng chuyển đổi androgen thành estrogen, gây ra stress oxy hóa và rối loạn điều hòa tuyến yên-vùng dưới đồi, góp phần làm tăng tổn thương DNA của tinh trùng [8]. Một số nghiên cứu cho thấy tình trạng béo phì có tác động tiêu cực đến chất lượng tinh trùng. Ngược lại, cũng có nghiên cứu chỉ ra rằng không có mối tương quan giữa chiều cao, cân

nặng, BMI với sự phân mảnh DNA tinh trùng [10]. Một phân tích tổng hợp phân tích 14 nghiên cứu bao gồm 8255 người tham gia cũng kết luận rằng không có đủ dữ liệu để chứng minh mối liên quan giữa BMI và DFI [11]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy nam giới không phân mảnh DNA tinh trùng có BMI thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm phân mảnh DNA ( $p=0,045$ ).

Trên thực tế khoảng 8% nam giới vô sinh có các thông số tinh dịch đồ bình thường nhưng lại có độ phân mảnh DNA tinh trùng cao [12]. Hiện nay, trong nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của sự phân mảnh DNA tinh trùng đến kết quả hỗ trợ sinh sản và thụ tinh ống nghiệm, các tác giả đã báo cáo về mối liên quan giữa sự phân mảnh DNA tinh trùng với các chỉ số trong xét nghiệm tinh dịch đồ. Trong khi một số nghiên cứu cho thấy mối tương quan chặt chẽ giữa DFI và các thông số tinh trùng của nam giới thì những nghiên cứu khác lại không tìm thấy bất kỳ mối liên hệ nào. Theo nghiên cứu của tác giả Lê Minh Tâm và cộng sự (2019), chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng không tương quan với tất cả các thông số tinh dịch đồ thông thường mà chỉ tương quan với mật độ, tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới và bất thường hình thái, đặc biệt là bất thường đầu tinh trùng [13]. Nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới của nhóm DFI < 15% cao hơn có ý nghĩa so với nhóm DFI  $\geq$  15% ( $p = 0,042$ ) và bất thường cổ đuôi tinh trùng ở nhóm có DFI < 15% lại thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm DFI  $\geq$  15% ( $p = 0,043$ ), tuy nhiên các thông số khác như mật độ, sức sống tinh trùng hay bất thường đầu tinh trùng lại không có khác biệt có ý nghĩa giữa 2 nhóm nghiên cứu. Nhóm tác giả Jun-Hee Chi và cộng sự (2017) đã chứng minh sự phân mảnh DNA tinh trùng có tương quan nghịch chặt chẽ hơn đáng kể với khả năng di chuyển nhanh so với khả năng di chuyển trung bình hoặc chậm của tinh trùng. Ngoài ra, DFI tinh trùng cũng có mối tương quan nghịch với tất cả các thông số động học, và tương quan mạnh nhất với vận tốc đường đi trung bình ( $r = -0,403$ ) và độ tuyến tính ( $r = -0,412$ ), điều này chứng tỏ tinh trùng có tính toàn vẹn DNA cao sẽ di chuyển một khoảng cách xa trong một thời gian nhất định. Kết quả này cho thấy việc chọn lọc tinh trùng có khả năng di chuyển nhanh có thể là một cách tiếp cận để chọn lọc tinh trùng có tính toàn vẹn DNA cao [14].

Nghiên cứu của chúng tôi xem xét tác động của sự phân mảnh DNA tinh trùng đến kết quả IVF cổ điển, cụ thể là tỷ lệ thụ tinh, đặc điểm phôi ngày 2 và kết quả tạo phôi ngày 5. Kết quả cho thấy sự hiện diện của tinh trùng có DNA phân mảnh trong IVF đã làm giảm tỷ lệ thụ tinh, cụ thể nhóm DFI > 15% có tỷ

lệ thụ tinh là 68,73%, thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm có DFI < 15% (76,41%,  $p=0,037$ ). Mối tương quan nghịch cũng được tìm thấy giữa mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và kết quả thụ tinh bình thường với  $r=-0,27$ ,  $p=0,031$ . Những kết quả như vậy cũng được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu [12], [15]. DNA tinh trùng mang thông tin di truyền của người cha, và tính toàn vẹn của nó là cần thiết để truyền vật chất di truyền cho con cái một cách chính xác. Tổn thương chất nhiễm sắc của tinh trùng có thể ảnh hưởng trực tiếp đến chức năng và hình thái bình thường của tinh trùng. Do đó, ở những bệnh nhân có DFI cao thì sự xâm nhập của tinh trùng vào cấu trúc mạng lưới cumulus/hyaluronate và sự gắn thụ thể tinh trùng vào màng ZP của noãn có thể bị hạn chế, từ đó làm giảm khả năng truyền vật chất di truyền vào noãn và có thể ảnh hưởng đến quá trình thụ tinh bình thường. Tuy nhiên một số nghiên cứu đã báo cáo ngược lại rằng không có mối tương quan giữa sự phân mảnh DNA tinh trùng và tỷ lệ thụ tinh sau IVF cổ điển [16], [17].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi ghi nhận không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm DFI về kết quả phôi ở giai đoạn phân chia (ngày 2) và giai đoạn phôi nang (ngày 5) trong chu kỳ IVF cổ điển. Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu như báo cáo của nhóm tác giả Anbari (2020) về tỷ lệ phân mảnh DNA tinh trùng cao không có tác động đến hình thái phôi và động học phôi trong chu kỳ IVF [18] hay của tác giả Xue và cộng sự (2016) về không có sự liên quan giữa DFI với tỷ lệ phôi phân chia trong chu kỳ IVF [17]. Theo Zheng và cộng sự (2018), sự hình thành tiền nhân và sự phát triển phôi sớm dường như không phụ thuộc vào tính toàn vẹn DNA của tinh trùng vì bộ gen của phôi chỉ được biểu hiện sau lần phân bào thứ hai. Ngoài ra, nếu mức độ tổn thương DNA nằm trong khả năng sửa chữa của tế bào noãn thì phôi vẫn có thể phát triển ngay cả khi DNA tinh trùng bị tổn thương cao [19]. Tuy nhiên, theo một số nghiên cứu khác sự phân mảnh DNA được phát hiện có liên quan đến quá trình hình thành phôi nang, động học phát triển phôi và chất lượng phôi [15], [16]. Nghiên cứu của Oleszczuk và cộng sự cho biết ở những chu kỳ IVF, khi DFI > 20% thì khả năng thu được phôi có chất lượng tốt sẽ giảm [20].

Nghiên cứu của chúng tôi vẫn tồn tại một số hạn chế nhất định. Sở dĩ có sự khác biệt về kết quả nghiên cứu như vậy vì nghiên cứu này có thiết kế nghiên cứu, số lượng cỡ mẫu, phương pháp xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng và thời điểm xét nghiệm khác so với các nghiên cứu trên thế giới.

## 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Nhóm DFI  $\leq 15\%$  có tỷ lệ thụ tinh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm DFI  $> 15\%$ . Nghiên cứu không nhận thấy sự khác biệt giữa 2 nhóm phân mảnh DNA tinh trùng về đặc điểm phôi ngày 2. Mặc dù tỷ lệ phôi nang tốt và tỷ lệ phôi nang hữu dụng ở nhóm DFI  $\leq 15\%$  có xu hướng cao hơn nhưng những khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Đánh giá về mối liên quan giữa DFI và kết quả IVF cổ điển cho thấy sự phân mảnh DNA tinh trùng có mối tương

quan nghịch với tỷ lệ thụ tinh sau khi thực hiện IVF cổ điển.

Có thể thấy xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng có giá trị trong chẩn đoán vô sinh, giải thích nguyên nhân dẫn đến thất bại trong hỗ trợ sinh sản, góp phần tiên lượng kết quả trong điều trị vô sinh. Cần tiến hành nghiên cứu trên cỡ mẫu lớn hơn để chuẩn hoá các phương pháp xét nghiệm, các biến số tinh trùng và giá trị tham chiếu trước khi bổ sung xét nghiệm vào quy trình hỗ trợ sinh sản thông thường.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê MT. Các vấn đề trọng yếu trong Hỗ trợ sinh sản, tập 2: Dành cho phôi học lâm sàng. Hà Nội: Nhà xuất bản Y học; 2022.
2. Purity N, Wim G, Jelena A, Silke D, Gitau M, James K. Financial costs of assisted reproductive technology for patients in low- and middle-income countries: a systematic review. *Human Reproduction Open*. 2023; 2.
3. Gill K, Jakubik J, Rosiak-Gill A et al. Utility and predictive value of human standard semen parameters and sperm DNA dispersion for fertility potential. *International Journal of Environmental Research Public Health*. 2019; 16(11):2004.
4. Choi HY, Kim SK, Kim SH, Choi YM, Jee BC. Impact of sperm DNA fragmentation on clinical in vitro fertilization outcomes. *Clin Exp Reprod Med*. 2017 Dec; 44(4):224-231.
5. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*. 2011; 26(6):1270-83.
6. Khalafalla K, Majzoub A, Elbardisi H, Bhatella A, Chaudhari A, Agarwal A, Henkel R, AlMarzooki T, Burjaq H, Arafa M. The effect of sperm DNA fragmentation on intracytoplasmic sperm injection outcome. *Andrologia*. 2021 Nov; 53(10):14180.
7. Pino V, Sanz A, Valdés N et al. The effects of aging on semen parameters and sperm DNA fragmentation. *JBRA assisted reproduction*. 2020; 24(1):82-86.
8. Le MT, Nguyen DN, Le DD, Tran NQT. Impact of body mass index and metabolic syndrome on sperm DNA fragmentation in males from infertile couples: A cross-sectional study from Vietnam. *Metabol Open*. 2020; 7:100054.
9. Chua SC, Yovich SJ, Hinchliffe PM, Yovich JL. Male Clinical Parameters (Age, Stature, Weight, Body Mass Index, Smoking History, Alcohol Consumption) Bear Minimal Relationship to the Level of Sperm DNA Fragmentation. *J Pers Med*. 2023 Apr 28; 13(5):759.
10. Dupont C, Faure C, Sermondade N, Boubaya M, Eustache F, Clément P, Briot P, Berthaut I, Levy V, Cedrin-Durnerin I, et al. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J. Androl*. 2013; 15:622-625.
11. Sepidarkish M, Maleki-Hajiagha A, Maroufizadeh S, Rezaeinejad M, Almasi-Hashiani A, Razavi M. The effect of body mass index on sperm DNA fragmentation: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Obes*. 2020; 44:549-558.
12. Pourmasumi S, Nazari A, Fagheirelahee N, Sabeti P. Cytochemical tests to investigate sperm DNA damage: Assessment and review. *J Family Med Prim Care*. 2019 May; 8(5):1533-1539.
13. Le MT. Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters?. *Reprod Med Biol*. 2019; 18(4):390-6.
14. Chi HJ, Kim SG, Kim YY, Park JY, Yoo CS, Park IH, Sun HG, Kim JW, Lee KH, Park HD. ICSI significantly improved the pregnancy rate of patients with a high sperm DNA fragmentation index. *Clin Exp Reprod Med*. 2017 Sep; 44(3):132-140.
15. Yang H, Li G, Jin H, Guo Y, Sun Y. The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle. *Transl Androl Urol*. 2019 Aug; 8(4):356-365.
16. Tang L, Rao M, Yang W, Yao Y, Luo Q, Lu L, Wang L, Zhao S. Predictive value of the sperm DNA fragmentation index for low or failed IVF fertilization in men with mild-to-moderate asthenozoospermia. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2021 Jun; 50(6):101868.
17. Xue LT, Wang RX, He B, Mo WY, Huang L, Wang SK, Mao XB, Cheng JP, Huang YY, Liu R. Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcomes for Chinese couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *J Int Med Res*. 2016; 44:1283-1291.
18. Anbari F, Khalili MA, Agha-Rahimi A, Maleki B, Nabi A, Esfandiari N. Does sperm DNA fragmentation have negative impact on embryo morphology and morphokinetics in IVF programme?. *Andrologia*. 2020; 00:e13798
19. Zheng WW, Song G, Wang QL, Liu SW, Zhu XL, Deng SM, Zhong A, Tan YM, Tan Y. Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following in vitro fertilization. *Asian J Androl*. 2018 Jan-Feb; 20(1):75-79.
20. Oleszczuk K, Giwercman A, Bungum M. Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome. *Andrologia*. 2016; 4:290-296.