

MỐI LIÊN HỆ GIỮA MỨC ĐỘ PHÂN MẢNH DNA TINH TRÙNG VÀ CÁC CHỈ SỐ TINH DỊCH ĐỎ Ở NAM GIỚI VÔ SINH

Dương Thị Nhân^{1,2}, Nguyễn Phú Hùng^{1*}

¹Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên,

²Khoa Hỗ trợ Sinh sản - Bệnh viện A Thái Nguyên

TÓM TẮT

Các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng mức độ đứt gãy DNA tinh trùng ở nam giới vô sinh cao hơn ở người bình thường và có mối liên quan giữa mức độ dị dạng của tinh trùng với sự phân mảnh DNA tinh trùng. Tuy nhiên, yếu tố để dự đoán mức độ phân mảnh DNA tinh trùng không phải là hình dạng tinh trùng và những tinh trùng bình thường vẫn có thể mang DNA bị phân mảnh. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiến hành xác định sự phân mảnh DNA tinh trùng bằng phương pháp SCSA (Sperm chromatin structure assay) và đánh giá mối tương quan giữa các chỉ số tinh dịch đồ với mức độ phân mảnh DNA tinh trùng. Kết quả nghiên cứu này chỉ ra rằng tỷ lệ phân mảnh cao liên quan đến mức độ di động và tỷ lệ sống của tinh trùng. Mặt khác, ở độ pH thấp, < 7,2 thì tỷ lệ phân mảnh DNA của tinh trùng cao hơn rõ rệt so với nhóm pH $\geq 7,2$. Không có sự khác biệt nào về mức độ phân mảnh của tinh trùng theo độ tuổi và mật độ tinh trùng.

Từ khóa: Y- sinh; phân mảnh DNA tinh trùng; tinh dịch đồ; vô sinh nam, SCSA.

Ngày nhận bài: 01/02/2020; Ngày hoàn thiện: 08/6/2020; Ngày đăng: 11/6/2020

THE ASSOCIATION BETWEEN SPERM DNA FRAGMENTATION INDEX AND CONVENTIONAL SEMEN PARAMETERS IN MALE PATIENTS WITH INFERTILITY

Duong Thi Nhan^{1,2}, Nguyen Phu Hung^{2*}

¹TNU - University of Sciences,

²Assisted Reproductive Unit – Hospital A – Thai Nguyen

ABSTRACT

Many recent studies have shown that the level of sperm DNA fragmentation is higher in male infertility than in normal people and there is a correlation between sperm deformity and sperm DNA fragmentation, but the factor to predict the degree of sperm fragmentation is not the sperm shape and the normal sperm can still carry fragmented DNA. In this study, the authors developed a procedure to determine the fragmentation of sperm DNA by SCSA method and evaluate the correlation between semen index and degree of sperm DNA fragmentation. Our results suggest that sperm DNA fragmentation index is closely associated with sperm mobility and sperm viability. On the other hand, at a pH < 7.2, the fractionation level is significantly higher than that of the group with a pH ≥ 7.2 . There is no difference in the degree of sperm fragmentation by age and sperm density.

Keywords: Biomedicine; Sperm DNA fragmentation; human semen; male infertility; SCSA.

Received: 01/02/2020; Revised: 08/6/2020; Published: 11/6/2020

* Corresponding author. Email: hungnguyenphu@tnu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Vô sinh đã trở nên phổ biến trên toàn thế giới và ảnh hưởng đến hơn 70 triệu cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh sản [1]. Theo ghi nhận của y văn thế giới, tỷ lệ vô sinh nam chiếm từ 30 – 40% và cách đây hơn 10 năm, tỷ lệ nam giới điều trị hiếm muộn có liên quan đến bất thường tinh dịch chiếm 77,3% [2]. Trong hai thập kỷ qua, hình thái tinh trùng được công nhận là một yếu tố dự báo quan trọng về kết quả trong thụ tinh nhân tạo IVF và ICSI [3]. 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 [4]. Đồng thời có mối liên quan giữa mức độ bất thường về hình dạng của tinh trùng với sự phân mảnh DNA tinh trùng [5]. Tuy nhiên, những tinh trùng có hình dạng bình thường và khả năng di động tốt, mật độ cao vẫn tiềm ẩn khả năng bị phân mảnh DNA hệ gen [5].

Tinh trùng có mức độ phân mảnh DNA cao sẽ ảnh hưởng tới kết quả có thai tự nhiên cũng như của các trường hợp bệnh nhân được điều trị bằng các phương pháp hỗ trợ sinh sản. Trong đó, làm giảm tỷ lệ thụ tinh đối với các trường hợp làm ICSI, tăng nguy cơ sảy thai, giảm chất lượng phôi, giảm tỷ lệ làm tổ [4]. Theo AzizN và cộng sự (2008), thất bại của IUI đòi hỏi phải đánh giá thêm các đặc tính sinh học của tinh trùng, chẳng hạn như dấu hiệu apoptotic và phân mảnh DNA tinh trùng [6].

Năm 2016, một hội đồng bao gồm năm bác sĩ tiết niệu và bác sĩ nội khoa cùng với chuyên gia về vô sinh nam đã đưa ra khuyến nghị dựa trên bằng chứng và đưa ra các phương pháp đánh giá sự phân mảnh DNA tinh trùng [1]. Các phương pháp đánh giá mức độ phân mảnh của tinh trùng đã được xây dựng thành công trong những năm gần đây như phương pháp khảo sát cấu trúc nhiễm sắc chất tinh trùng (SCSA), phương pháp điện di trên cá thể tế bào đơn (COMET), phương pháp nhuộm acridine orange (AOT), phương pháp đánh dấu đứt gãy DNA bằng các dUTP được

xúc tác bởi enzyme terminal deoxynucleotidyltransferase (TUNEL), phương pháp dịch mã đứt gãy tại chỗ (ISNT) và phương pháp khảo sát sự phân tán nhiễm sắc chất của tinh trùng (SCD) [7]. Một trong những phương pháp phổ biến và hiện đại nhất hiện nay được sử dụng để đánh giá sự phân mảnh DNA tinh trùng là phương pháp SCSA. Phương pháp này sẽ định lượng sự phân mảnh DNA trực tiếp dựa vào sự kết hợp DNA bị biến tính với chất nhuộm DNA huỳnh quang acridine orange. Giá trị ngưỡng của SCSA đã được xác định và đưa vào trong chẩn đoán lâm sàng [8]. SCSA là một phương pháp có nhiều tiềm năng hỗ trợ cho chẩn đoán và điều trị của các cặp vợ chồng hiếm muộn. Mục tiêu trong nghiên cứu này là nhóm tác giả tiến hành đánh giá có hay không mối liên hệ giữa mức độ phân mảnh của tinh trùng (bằng kỹ thuật SCSA) với các chỉ số tinh dịch đồ để làm cơ sở cho việc nâng cao chất lượng thụ tinh trong ống nghiệm (IVF).

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu tinh dịch của 119 bệnh nhân nam được lấy bằng phương pháp thủ dâm khi đến khám tại khoa Hỗ trợ Sinh sản - Bệnh viện A Thái Nguyên.

Tiêu chuẩn loại trừ: Loại bỏ các mẫu tinh dịch có thể tích dưới 0,2 ml hoặc các mẫu không có hoặc có rất ít tinh trùng (Azoospermia).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang.

2.3. Phương pháp thu nhận mẫu bệnh phẩm và dữ liệu tinh dịch đồ

Mẫu tinh dịch sau khi xuất tinh được thu nhận vào lọ đựng mẫu chuyên dụng và chờ ly giải từ 15 – 60 phút. Sau đó, khi mẫu được đánh giá mật độ, độ di động và một số chỉ tiêu khác theo quy trình chuẩn (WHO, 2010) [9], dữ liệu được thu nhận và dùng trong các phân tích tiếp theo. Mẫu tinh dịch được lưu trữ ở -20°C và -86°C và được phân tích tại phòng thí Công nghệ gen và Tế bào - Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên.

2.4. Phương pháp khảo sát cấu trúc nhiễm sắc chất (SCSA)

Bước 1: Pha loãng mẫu tinh dịch trong dung dịch TNE 1X đến mật độ 1 – 2.106 tinh trùng/mL.

Bước 2: Xử lý mẫu với dung dịch acid loãng (HCl 0,08N) trong 30 giây.

Bước 3: Nhuộm mẫu với dung dịch AO (6 µg/ml) trong 30 giây.

Bước 4: Chạy mẫu qua máy FCM (chạy lặp lại 2 lần cho một mẫu).

Điều chỉnh thông số của máy FCM để máy thu nhận 10.000 sự kiện.

Bước 5: Xử lý số liệu và tính chỉ số DFI bằng phần mềm BD Accuri C6. Số liệu thu được từ 10.000 sự kiện sẽ được lọc và loại bỏ các tín hiệu nhiễu, loại bỏ các tế bào HDS (tín hiệu xanh quá cao).

Chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng (DNA Fragmentation Index – DFI) được xác định dựa vào công thức sau [10]:

$$DFI = \frac{\text{Tín hiệu huỳnh quang màu đỏ}}{\text{Tổng tín hiệu huỳnh quang (đỏ + xanh lá)}} (\%)$$

Dựa vào chỉ số DFI, sự phân mảnh DNA tinh trùng được chia thành 3 mức độ [10]:

- DFI ≤ 15% phân mảnh DNA tinh trùng ở mức độ thấp.
- 15% < DFI < 30% phân mảnh DNA mức trung bình.
- DFI ≥ 30% phân mảnh DNA mức cao.

Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiến hành phân tích mối tương quan giữa các chỉ số tinh dịch đồ, độ tuổi, với 2 mức độ phân mảnh của tinh trùng gồm (1) mức độ cao (DFI ≥ 30%) và (2) mức độ trung bình và thấp (DFI < 30%). Độ tuổi được chia làm 2 nhóm là ≥ 35 tuổi và < 35 tuổi.

2.5. Các biến số trong nghiên cứu

Các biến số trong nghiên cứu gồm: độ tuổi, độ pH của tinh dịch, mật độ tinh trùng, độ di động, tỷ lệ sống, hình dạng tinh trùng và độ phân mảnh của tinh trùng.

2.6. Phân tích xử lý số liệu

Dữ liệu thu được được phân tích theo Chi-Square Test trên phần mềm GraphPad Prism 5.0.

Nghiên cứu tuân thủ các quy định về y đức và chỉ nhằm mục đích khoa học, được Hội đồng Y đức Bệnh viện A cho phép triển khai.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm nhóm tuổi và các chỉ số tinh dịch đồ của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm về tuổi và tinh dịch đồ của 119 bệnh nhân đến khám và điều trị tại Khoa hỗ trợ sinh sản – Bệnh viện A Thái Nguyên trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm về tuổi và tinh dịch đồ của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm	Trung bình ± độ lệch chuẩn	Giới hạn
Tuổi	32,86 ± 6,40	22 - 53
Thời gian kiêng xuất tinh (ngày)	4,05 ± 1,55	2 - 15
Thể tích xuất tinh (ml)	2,95 ± 1,27	1 - 7
Độ pH	7,96 ± 6,17	7,0 – 7,8
Mật độ (x10 ⁶ tinh trùng/mL)	22,29 ± 13,14	1 - 73
Di động tiến tới PR (%)	24,53 ± 6,34	0 - 38
Di động không tiến tới NP (%)	26,77 ± 6,34	0 - 44
Bất động IM (%)	48,80 ± 10,27	31 - 100
Tỷ lệ sống (TLS) (%)	65,11 ± 10,52	10 - 85
Hình dạng tinh trùng (%)	1,17 ± 0,47	1 - 4

Theo số liệu thống kê, độ tuổi trung bình của bệnh nhân đến khám vô sinh nam trung bình là 32,86 tuổi. Điều này cho thấy khuynh hướng vô sinh ở nam giới ngày càng trẻ hóa. Các chỉ số được phân tích trong tinh dịch đồ cũng chỉ ra hầu hết có chỉ số pH > 7,2, mật độ tinh trùng dao động từ 1 – 73.10⁶. Tỷ lệ sống của tinh trùng trung bình là 65% nhưng có sự dao động lớn từ 10% - 85%, điều này cho thấy một bộ phận bệnh nhân có chất lượng tinh trùng kém.

3.2. Tương quan giữa chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng và độ tuổi của bệnh nhân vô sinh

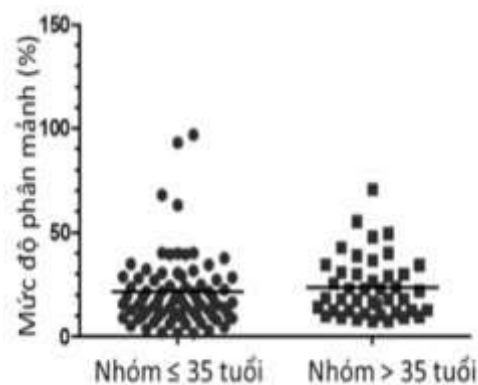
Các đối tượng đến khám tại khoa Hỗ trợ sinh sản - Bệnh viện A Thái Nguyên đều trong độ

tuổi sinh sản. Nhóm tác giả đã tiến hành phân tích tinh dịch đồ từ 119 mẫu bệnh phẩm sau khi các mẫu tinh trùng này được lấy bằng phương pháp thủ dâm, đánh giá đại thể và vi thể theo tiêu chuẩn của WHO (2010). Một phần tinh dịch được chuyển sang Phòng thí nghiệm Công nghệ gen và tế bào – Trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên để tiến hành phân tích độ phân mảnh DNA tinh trùng bằng phương pháp SCSA trên hệ thống Flow cytometry Accuri C6 Plus.

Sự phân bố của mỗi nhóm bệnh nhân và chỉ số phân mảnh tương ứng được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Nhóm tuổi và mức độ phân mảnh DNA tinh trùng

Nhóm tuổi	Chỉ số phân mảnh DFI		Tổng (trường hợp)	P
	DFI < 30	DFI ≥ 30		
≤35 tuổi	60	16	76	0,262
>35 tuổi	30	13	43	



Hình 1. Tương quan giữa chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng và độ tuổi

Bảng 2 cho thấy, sự khác biệt về mức độ phân mảnh theo nhóm tuổi trong nghiên cứu này là không rõ ràng ($p = 0,2625$). Điều này chỉ ra rằng, ở bất cứ độ tuổi nào, DNA của tinh trùng vẫn có thể bị phân mảnh. Một kết quả tương tự cũng đã được Salah Elbashir chỉ ra trước đó với $P = 0,076$ [11].

Hình 1 cho thấy mức độ phân mảnh DNA tinh trùng khoảng 22 - 23% giữa các nhóm

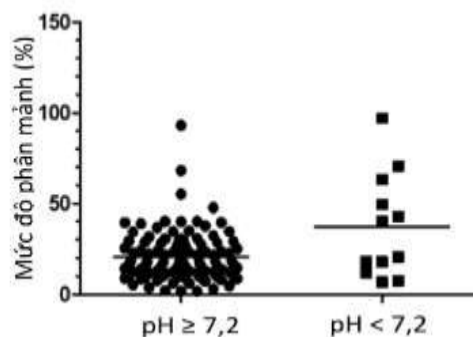
tuổi. Tuy nhiên, ở nhóm tuổi dưới 35 vẫn có một vài trường hợp có tỷ lệ mức độ phân mảnh của tinh trùng khá cao.

3.3. Tương quan giữa chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng và độ pH

Ngoài các chỉ số về tinh trùng, các trị số về pH tinh dịch cũng có giá trị quan trọng trong đánh giá vô sinh ở nam giới. Ở trạng thái sinh lý bình thường, dịch túi tinh mang tính kiềm, trong khi đó dịch tuyến tiền liệt mang tính axit, sự pha trộn của hai dịch này làm cho độ pH của tinh dịch có tính kiềm ($pH = 7,2 - 8$). Kết quả phân tích trong bảng 3 cho thấy, số lượng bệnh nhân có pH tinh dịch thấp chỉ chiếm tỷ lệ 12/119 nhưng 50% trong số đó có DFI ở mức cao (hình 2). Tỷ lệ này cao hơn rõ rệt so với nhóm có chỉ số pH lớn hơn 7,2 với 23/107 trường hợp có mức độ phân mảnh cao ($p = 0,0292$). Điều này có thể được giải thích rằng, những bệnh nhân có pH tinh dịch < 7,2 là những trường hợp mà tinh dịch có thể chứa dịch tiết chủ yếu từ tuyến tiền liệt và chức năng tinh hoàn có thể bị suy giảm.

Bảng 3. Chỉ số pH và mức độ phân mảnh của tinh trùng

Độ pH của tinh dịch	Chỉ số phân mảnh DFI		Tổng (trường hợp)	P
	DFI < 30	DFI ≥ 30		
pH < 7,2	6	6	12	0,0292
pH ≥ 7,2	84	23	107	
Tổng (trường hợp)	90	29	119	



Hình 2. Mức độ phân mảnh theo độ pH của tinh dịch

Nếu túi tinh không có, teo hay vô chức năng, hay bế tắc cả hai ống phóng tinh, thể tích tinh

dịch sẽ thấp (<1 mL) và pH axit ($< 7,0$) vì tinh dịch chỉ có dịch tuyến tiền liệt là chủ yếu. Kết quả trong nghiên cứu này cũng phù hợp với công bố trước đó về ảnh hưởng của pH lên mức độ phân mảnh của tinh trùng [12].

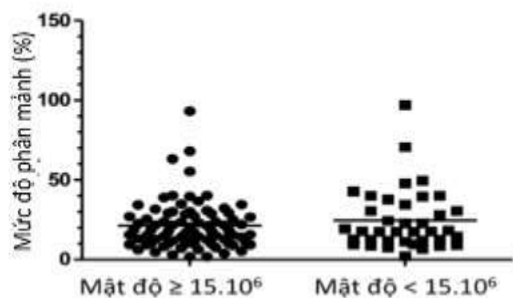
3.4. Tương quan giữa chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng và mật độ tinh trùng

Trong hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới về đánh giá chất lượng tinh dịch người năm 1999, mật độ tinh trùng tối thiểu đạt được là 20.106TT/ml đối với người có khả năng sinh sản bình thường. Tuy nhiên, do nhiều nguyên nhân khác nhau đã dẫn tới sự suy giảm chất lượng tinh dịch của nam giới. Năm 2010, Tổ chức Y tế thế giới đã đưa ra hướng dẫn đánh giá chất lượng tinh dịch người và theo đó, mật độ tinh trùng tối thiểu của một người nam có khả năng sinh sản bình thường là 15.106 TT/ml.

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả chỉ ra rằng không có mối liên hệ nào giữa mật độ tinh trùng và mức độ phân mảnh DNA tinh trùng được tìm thấy, hay nói cách khác chúng độc lập với nhau ($p = 0,2096$) (bảng 4 và hình 3).

Bảng 4. Mật độ tinh trùng và chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng

Mật độ tinh trùng (TT/ml)	Chỉ số phân mảnh DFI		Tổng (trường hợp)	P
	DFI < 30	DFI ≥ 30		
Mật độ < 15.106	26	12	38	0,2096
Mật độ ≥ 15.106	64	17	81	
Tổng (trường hợp)	90	29	119	



Hình 3. Mức độ phân mảnh theo mật độ của tinh trùng

Trong một nghiên cứu của Zhonghua và cộng sự đã sử dụng phương pháp SCD (sperm chromatin dispersion) để phân tích mức độ phân mảnh của tinh trùng trên và chỉ ra chúng có mối liên hệ với mật độ của tinh trùng ($p < 0,01$) [13].

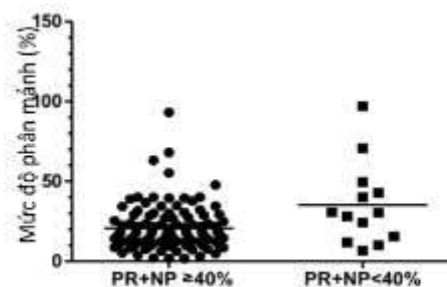
Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả phù hợp với một nghiên cứu gần đây của Salah Elbashir (2018) trên 182 trường hợp đã chỉ ra rằng không có mối liên hệ nào giữa mức độ phân mảnh với mật độ của tinh trùng (T test, $p = 0,181$) [14].

3.5. Tương quan giữa chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng và độ di động

Độ di động của tinh trùng được đánh giá theo tiêu chuẩn của WHO 2010.

Bảng 5. Mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và độ di động của tinh trùng

Độ di động (PR + NP)	Chỉ số phân mảnh DFI		Tổng (trường hợp)	P
	DFI < 30	DFI ≥ 30		
	PR	NP		
PR + NP $\geq 40\%$	84	22	106	0,0087
PR + NP $< 40\%$	6	7	13	
Tổng (trường hợp)	90	29	119	



Hình 4. Mức độ phân mảnh theo độ di động của tinh trùng

Các chỉ số được đánh giá bao gồm các chỉ số PR là số tinh trùng di động tiến tới và NP là chỉ số tinh trùng di động không tiến tới. Độ di động của một người nam bình thường khi giá trị tối thiểu đạt 40% cho cả 2 chỉ số PR và NP.

Kết quả phân tích được chỉ ra trong bảng 5 và hình 4.

Trong nghiên cứu này, độ di động và mức độ phân mảnh DNA tinh trùng của các trường hợp vô sinh nam có mối tương quan mật thiết với nhau ($p = 0,0087$). Trước đó, mối liên hệ thuận giữa mức độ phân mảnh cao với độ di động kém đã được chỉ bởi Salah Elbashir ($p = 0,01$) [14].

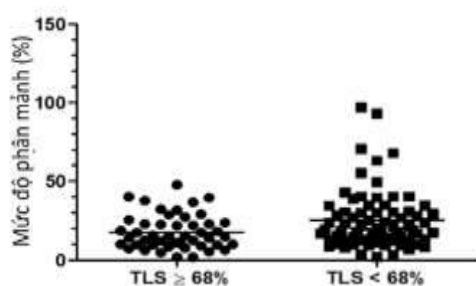
3.6. Tương quan giữa chỉ số phân mảnh DNA tinh trùng và tỷ lệ sống

Kết quả phân tích mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và tỷ lệ sống được thể hiện trong bảng 6 và hình 5.

Bảng 6. Mức độ phân mảnh DNA tinh trùng và tỷ lệ sống

Tỷ lệ sống của tinh trùng	Chỉ số phân mảnh DFI		Tổng (trường hợp)	P
	DFI < 30	DFI ≥ 30		
TLS < 68%	49	22	71	0,0409
TLS ≥ 68%	41	7	48	
Tổng (trường hợp)	90	29	119	

Tỷ lệ sống (TLS) trung bình của tinh trùng trong nghiên cứu này là $65,11 \pm 10,52$.



Hình 5. Mức độ phân mảnh theo tỷ lệ sống (TLS) của tinh trùng

Kết quả phân tích trong bảng 6 và hình 5 cho thấy nhóm có tỷ lệ sống thấp (dưới 68%) có mức độ phân mảnh cao hơn so với nhóm có tỷ lệ sống trên 68%. Sự sai khác này có ý nghĩa với $p = 0.0409$. Kết quả này phù hợp với các công bố trước đó [14], [15].

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã chỉ ra rằng, các bệnh nhân vô sinh nam có chỉ số pH

tinh dịch cao, độ di động tinh trùng kém và tỷ lệ sống nhỏ hơn 68% đều có tỷ lệ phân mảnh ở mức cao ($DFI \geq 30$) hơn rõ rệt so với nhóm tương ứng gồm các bệnh nhân có pH tinh dịch dưới 7,2, độ di động tốt và tỷ lệ sống trên 68%. Tuy nhiên, không có sự khác biệt nào về mức độ phân mảnh theo nhóm tuổi, theo mật độ tinh trùng. Đánh giá mức độ phân mảnh kết hợp với các đặc điểm tinh dịch đồ giúp đưa ra những phác đồ hỗ trợ sinh sản tốt hơn cho các bệnh nhân vô sinh nam.

Lời cảm ơn

Đề tài nghiên cứu nhận được sự giúp đỡ từ Bác sĩ CKH II Hà Hải Bằng, Bác sĩ Vũ Đào Minh Thông, Bác sĩ Hứa Minh Tuấn, Bác sĩ Trần Thu Lệ cùng tập thể Khoa hỗ trợ sinh sản Bệnh viện A Thái Nguyên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. A. Agarwal, A. Majzoub, S. C. Esteves, E. Ko, R. Ramasamy, and A. Zini, "Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios," *Transl Androl Urol*, vol. 5, no. 6, pp. 935-950, Dec. 2016.
- [2]. A. Agarwal, S. Roychoudhury, K. B. Bjugstad, and C.-L. Cho, "Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility?," *Ther Adv Urol*, vol. 8, no. 5, pp. 302-318, Oct. 2016.
- [3]. R. J. Aitken, and G. N. De Iuliis, "Origins and consequences of DNA damage in male germ cells," *Reprod. Biomed. Online*, vol. 14, no. 6, pp. 727-733, Jun. 2007.
- [4]. J. G. Alvarez, "DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility," *Minerva Ginecol*, vol. 55, no. 3, pp. 233-239, Jun. 2003.
- [5]. C. Avendaño, A. Franchi, H. Duran, and S. Oehninger, "DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome," *Fertil. Steril.*, vol. 94, no. 2, pp. 549-557, Jul. 2010.
- [6]. N. Aziz, and A. Agarwal, "Evaluation of sperm damage: beyond the World Health

- Organization criteria,” *Fertil. Steril.*, vol. 90, no. 3, pp. 484-485, Sep. 2008.
- [7]. C. Celik-Ozenci *et al.*, “Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations,” *Hum. Reprod.*, vol. 19, no. 9, pp. 2052-2059, Sep. 2004.
- [8]. D. P. Evenson, “Sperm chromatin structure assay (SCSA®),” *Methods Mol. Biol.*, vol. 927, pp. 147-164, 2013.
- [9]. X.-W. Cao, K. Lin, C.-Y. Li, and C.-W. Yuan, “[A review of WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5th edition)],” *Zhonghua Nan Ke Xue*, vol. 17, no. 12, pp. 1059-1063, Dec. 2011.
- [10]. D. Evenson, and L. Jost, “Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment,” *Methods Cell Sci*, vol. 22, no. 2-3, pp. 169-189, 2000.
- [11]. S. Elbashir, Y. Magdi, A. Rashed, M. A. Ibrahim, Y. Edris, and A. M. Abdelaziz, “Relationship between sperm progressive motility and DNA integrity in fertile and infertile men,” *Middle East Fertility Society Journal*, vol. 23, no. 3, pp. 195-198, Sep. 2018.
- [12]. D. Evenson, and L. Jost, “Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment,” *Methods Cell Sci*, vol. 22, no. 2-3, pp. 169-189, 2000.
- [13]. Y. Qiu, L. Wang, L. Zhang, D. Yang, A. Zhang, and J. Yu, “[Analysis of sperm chromosomal abnormalities and sperm DNA fragmentation in infertile males],” *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, vol. 25, no. 6, pp. 681-685, Dec. 2008.
- [14]. S. Elbashir, Y. Magdi, A. Rashed, M. A. Ibrahim, Y. Edris, and A. M. Abdelaziz, “Relationship between sperm progressive motility and DNA integrity in fertile and infertile men,” *Middle East Fertility Society Journal*, vol. 23, no. 3, pp. 195-198, 2018.
- [15]. Y. Qiu, L. Wang, L. Zhang, D. Yang, A. Zhang, and J. Yu, “[Analysis of sperm chromosomal abnormalities and sperm DNA fragmentation in infertile males],” *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, vol. 25, no. 6, pp. 681-685, Dec. 2008.